



## **Detección de especies de Helicobacter en perros y humanos**

**Corina Guendulain.**

Tesis (Doctorado en Ciencias de la Salud)--Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias  
Medicas, 2019..

Aprobada: 5 de marzo de 2020

---

Este documento está disponible para su consulta y descarga en RDU (Repositorio Digital de la Universidad Nacional de Córdoba). El mismo almacena, organiza, preserva, provee acceso libre y da visibilidad a nivel nacional e internacional a la producción científica, académica y cultural en formato digital, generada por los miembros de la Universidad Nacional de Córdoba. Para más información, visite el sitio <https://rdu.unc.edu.ar/>

Esta iniciativa está a cargo de la OCA (Oficina de Conocimiento Abierto), conjuntamente con la colaboración de la Prosecretaría de Informática de la Universidad Nacional de Córdoba y los Nodos OCA. Para más información, visite el sitio <http://oca.unc.edu.ar/>

---

Este trabajo tiene licencia [CC BY-NC-ND 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/). Por Corina Guendulain.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CORDOBA



FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS



# DETECCIÓN DE ESPECIES DE *Helicobacter* EN PERROS Y HUMANOS

Médica Veterinaria  
Especialista en Clínica Médica de Perros y Gatos  
**Corina Guendulain**

Trabajo de tesis para optar al grado de  
Doctora en Ciencias de la Salud

Directora: Dra. Griselda González

Codirectora: Dra. Ana Littvik

2019

LA FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS NO SE HACE SOLIDARIA CON LAS OPINIONES DE  
ESTA TESIS

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional de Córdoba, donde realicé esta carrera de cuarto nivel.

A la Universidad Nacional de Río Cuarto, mi querida Universidad, de la cual soy parte, que me permitió obtener este nuevo título de posgrado.

A la Dra. Griselda González, mi Directora de tesis, compañera de trabajo y amiga, quien siempre estuvo a mi lado, aún en las tareas más cotidianas de este trabajo, ayudándome y estimulándome.

A la Dra. Ana Littvik, mi Codirectora de tesis, y a los integrantes de la Comisión de seguimiento, el Dr. Alberto Eraso y la Dra. Claudia Mattana, quienes con sus consejos me guiaron para que mi investigación fuera más productiva, y sobre todo, con sus palabras cálidas y amables me hicieron sentir siempre que mi trabajo era importante.

A mis compañeros de trabajo y amigos, el MV Esp. Aníbal Bessone, la MV Esp. Marina Caffaratti y el MV Esp. Pablo González, quienes participaron en la realización de las endoscopías y toma de biopsias a los perros para este trabajo.

Al Dr. Pablo Tamiozzo, quien me enseñó con toda paciencia la técnica de PCR y me ayudó a realizarla con las biopsias gástricas de los perros de este trabajo.

Al Departamento Clínica Animal y al Departamento Patología Animal de la Facultad de Agronomía y Veterinaria y a todo el personal que de una u otra manera colaboraron con esta investigación.

Al Nuevo Hospital de Río Cuarto “San Antonio de Padua”, a las autoridades que me permitieron trabajar allí y a todo el personal que me hizo más fácil el trabajo.

A los Dres. Claudio Moscone, Marcos Miguel, Marcos Olivero y Carolina Balducci quienes me brindaron todo su apoyo para la realización de este trabajo, tomando las muestras de biopsias a los pacientes humanos, y a la Dra. Silvia Ezcurra y al Dr. Carlos González Achaval quienes realizaron el estudio histopatológico de las mismas.

Al Dr. Bram Flahou de la Universidad de Ghent y a la Dra. Cinthia Goldman de la Universidad de Buenos Aires por facilitarme los controles positivos para las PCRs.

A los pacientes que aceptaron participar de esta investigación y que con una gran predisposición permitieron que sus mascotas fueran incluidas en el estudio.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>CAPÍTULO I</b> .....	3
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	4
1- EL GÉNERO <i>Helicobacter</i> .....	4
1-1- ESPECIES.....	4
1.1.1- <i>Helicobacter pylori</i> .....	4
1.1.1.1- Características morfológicas, bioquímicas y microbiológicas.....	4
1.1.1.2- Factores de virulencia.....	4
1.1.1.3- Hábitat.....	5
1.1.1.4- Epidemiología.....	5
1.1.1.5- Transmisión.....	6
1.1.1.6- Patología.....	7
1.1.1.7- Signos clínicos.....	7
1.1.1.8- Diagnóstico.....	8
1.1.1.8.1- Métodos no invasivos.....	8
1.1.1.8.1.1- Prueba del aliento.....	8
1.1.1.8.2- Métodos invasivos.....	8
1.1.1.8.2.1- Prueba rápida de la ureasa.....	8
1.1.1.8.2.2- Citología.....	8
1.1.1.8.2.3- Examen histológico.....	9
1.1.1.8.2.4- Serología.....	9
1.1.1.8.2.5- Cultivo microbiológico.....	9
1.1.1.8.2.6- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	10
1.1.1.8.2.7- Hibridación fluorescente <i>in situ</i> (FISH).....	10
1.1.1.8.2.8- Identificación de antígeno fecal.....	10
1.1.1.9- Tratamiento.....	11
1.1.2- Otras especies de <i>Helicobacter</i> que infectan el estómago del hombre y del perro.....	11
1.1.2.1- Características morfológicas.....	12
1.1.2.2- Especies predominantes.....	14
1.1.2.3- Factores de virulencia de especies NHPH.....	16
1.1.2.4- Ubicación.....	17
1.1.2.5- Prevalencia.....	18
1.1.2.6- Transmisión.....	20
1.1.2.7- Patología.....	21

1.1.2.8- Signos clínicos .....	25
1.1.2.9- Diagnóstico .....	25
1.1.2.10- Tratamiento .....	28
1.2.- ZONOSIS .....	30
<b>OBJETIVOS</b> .....	31
Objetivo general .....	31
Objetivos específicos .....	31
<b>CAPÍTULO II</b> .....	32
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	33
Primera etapa .....	33
Selección de perros .....	33
Reparo ético .....	33
Toma de muestras .....	35
Identificación de las muestras .....	34
Segunda etapa .....	34
Selección de pacientes humanos .....	34
Reparo ético .....	34
Toma de muestras .....	34
Identificación de las muestras .....	35
Perros de los pacientes humanos.....	35
Toma de muestras .....	35
Identificación de las muestras .....	36
Procesamiento de las muestras (primera y segunda etapa).....	36
Impronta .....	36
Histopatología.....	36
Reacción en cadena de la polimerasa .....	38
Extracción de ADN.....	38
Amplificación por PCR .....	39
<i>Helicobacter</i> spp .....	39
<i>H. pylori</i> .....	40
<i>H. bizzozeronii</i> , <i>H. felis</i> y <i>H. salomonis</i> .....	41
Otras especies de <i>Helicobacter</i> .....	42
<i>H. suis</i> .....	43
Análisis estadístico de los datos .....	43
<b>CAPÍTULO III</b> .....	44
<b>RESULTADOS</b> .....	45
Primera etapa .....	45

Impronta .....	45
Histopatología .....	45
PCR.....	48
Segunda etapa .....	49
Humanos .....	49
Histopatología.....	49
PCR.....	49
Perros.....	49
Impronta .....	49
Histopatología.....	50
PCR.....	57
Análisis estadístico de los datos.....	58
<b>CAPÍTULO IV</b> .....	60
<b>DISCUSIÓN</b> .....	61
Perros.....	61
Endoscopia.....	61
Aspecto endoscópico de la mucosa gástrica .....	61
Impronta .....	62
Histopatología.....	63
Tinciones .....	63
Cantidad de bacterias .....	63
Hallazgos histopatológicos.....	64
Prevalencia.....	66
Raza, sexo, edad .....	68
Estilo de vida .....	69
PCR.....	70
Especies encontradas.....	70
Humanos .....	73
Prevalencia.....	73
PCR.....	73
Especies encontradas.....	73
<b>CONCLUSIONES</b> .....	75
<b>CAPÍTULO V</b> .....	76
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	77
<b>ANEXOS</b> .....	101
Anexo 1: Tablas .....	102

Tabla 1: Resultados de las histopatologías, improntas y PCR de la mucosa gástrica de los perros de la primera etapa.....	102
Tabla 2: Resultados de las histopatologías, improntas y PCR de la mucosa gástrica de los perros de la segunda etapa.....	103
Tabla 3: Especies de <i>Helicobacter</i> en muestras gástricas de los humanos.....	104
Tabla 4: Especies de <i>Helicobacter</i> en muestras gástricas de los perros de la segunda etapa.....	105
Tabla 5: Especies de <i>Helicobacter</i> en biopsias gástricas de los perros y de sus propietarios.....	106
Tabla 6: Signos clínicos y hallazgos histopatológicos de los perros de la segunda etapa.....	108
Anexo 2: Consentimiento informado del paciente.....	110
Anexo 3: Consentimiento informado del propietario del perro.....	111
Anexo 4: Comité de ética.....	112
Anexo 5: Ficha de pacientes humanos.....	117
Anexo 6: Ficha de perros.....	118
Anexo 7: Producción.....	119

## ÍNDICE DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

Figura 1: Microfotografía electrónica de transmisión de <i>H. felis</i> , <i>H. bizzozeronii</i> y <i>H. salomonis</i> ...	13
Figura 2: Anatomía del estómago del perro .....	17
Figura 3: Ilustración de las capas del estómago .....	18

### CAPÍTULO II

Figura 1: Corrida electroforética en gel de agarosa de ADN amplificado por PCR.....	40
Figura 2: Corrida electroforética en gel de agarosa de ADN amplificado por PCR.....	42

### CAPÍTULO III

Figura 1: Impronta gástrica con estructuras compatibles con <i>Helicobacter</i> spp .....	45
Figura 2: Microfotografía de biopsia gástrica de perro, región fúndica .....	46
Figura 3: Microfotografía de biopsia gástrica de perro, región fúndica. ....	46
Figura 4: Aspecto normal de la mucosa gástrica de perro en la región del antro pilórico visualizada mediante endoscopia .....	47
Figura 5: Vista endoscópica de la región del cuerpo gástrico con abundante contenido.....	48
Figura 6: Impronta gástrica con estructuras compatibles con <i>Helicobacter</i> spp. ....	50
Figura 7: Corte histológico de biopsia gástrica de perro, región antral .....	50
Figura 8: Microfotografía de biopsia gástrica de perro, región antral .....	51
Figura 9: Microfotografía de biopsia gástrica de perro, región antral. ....	51
Figura 10: Vista endoscópica de la incisura angular del estómago de perro .....	52
Figura 11: Vista endoscópica de la región del antro pilórico.....	53
Figura 12: Microfotografía de biopsia gástrica de perro, región antral. ....	54
Figura 13: Microfotografía de biopsia gástrica de perro con estructuras espiraladas .....	54
Figura 14: Microfotografía de biopsia gástrica de perro, región antral .....	55
Figura 15: Microfotografía de biopsia gástrica de perro, región fúndica.....	56
Figura 16: Porcentaje de muestras gástricas positivas y negativas a <i>Helicobacter</i> spp. mediante impronta, histopatología y PCR.....	58
Figura 17: Muestras gástricas positivas y negativas a <i>Helicobacter</i> spp. mediante impronta y PCR .....	58
Figura 18: Perros y humanos positivos a <i>Helicobacter</i> spp. por PCR.....	59

## ÍNDICE DE TABLAS

### CAPÍTULO III

Tabla 1: Improntas de mucosa gástrica de perros .....	45
Tabla 2: Cantidad de bacterias en las histopatologías de las biopsias gástricas de perros.....	46
Tabla 3: Cantidad de bacterias en las histopatologías de las biopsias gástricas de perros y aspecto endoscópico de la mucosa .....	47
Tabla 4: Especies de <i>Helicobacter</i> encontradas en las biopsias gástricas de los perros de la primera etapa determinadas por PCR.....	48
Tabla 5: Especies de <i>Helicobacter</i> encontradas en las biopsias gástricas de humanos determinadas por PCR .....	49
Tabla 6: Improntas de mucosa gástrica de perros .....	49
Tabla 7: Cantidad de bacterias en las histopatologías de las biopsias gástricas de perros ....	51
Tabla 8: Cantidad de bacterias en las histopatologías de las biopsias gástricas de perros y aspecto endoscópico de la mucosa .. .....	52
Tabla 9: Cantidad de bacterias en las histopatologías de las biopsias gástricas de perros y signos clínicos .. .....	53
Tabla 10: Hallazgos histopatológicos en perros sin signos clínicos .. .....	55
Tabla 11: Hallazgos histopatológicos en perros con signos clínicos .. .....	56
Tabla 12: Especies de <i>Helicobacter</i> encontradas en biopsias gástricas de perros determinadas por PCR .. .....	57

## DETECCIÓN DE ESPECIES DE *Helicobacter* EN PERROS Y HUMANOS

### RESUMEN

*Helicobacter* es un género bacteriano Gram negativo que coloniza el estómago de humanos y perros, entre otros mamíferos. La especie más frecuentemente hallada en la mucosa gástrica del hombre es *H. pylori*, implicada en la patogénesis de las gastritis crónicas, úlceras y neoplasias gástricas, sin embargo, existen otras especies de *Helicobacter* en el estómago del hombre, como *H. suis*, *H. bizzozeronii*, *H. felis*, *H. salomonis* y *H. heilmannii sensu stricto*, denominadas *Helicobacter* no *H. pylori* (NHPH). El perro tiene una altísima prevalencia de infección de su mucosa gástrica con estas especies de NHPH, *H. felis*, *H. bizzozeronii*, *H. salomonis*, *H. cynogastricus* y *H. heilmannii sensu stricto* y es común la infección de dos o más especies en forma conjunta, mientras que *H. pylori* no lo infecta en forma natural. La detección de especies NHPH en la mucosa del estómago de seres humanos con enfermedad gástrica y en un alto porcentaje de perros, sugiere la posibilidad de que estos animales jueguen un rol importante en la patogenia y transmisión de la infección al hombre, postulándose la vía de transmisión oral-oral o bien fecal-oral. Si bien existen estudios en distintas zonas geográficas del mundo acerca de las especies NHPH, tanto en humanos como en perros, y algunos reportes aislados de casos humanos infectados con NHPH que motivó la búsqueda de estas especies en sus perros, no hay investigaciones que describan un estudio planificado que relacione la presencia de estas especies en un número significativo de humanos y de sus perros. El objetivo de este trabajo fue determinar si las personas con signos de gastritis crónica que tienen *Helicobacter* spp. y que poseen perros como mascotas, comparten con ellos las mismas especies. Para ello se estudió por PCR la presencia de *Helicobacter* spp. en muestras gástricas de 30 personas con signos clínicos de gastritis crónica y diagnóstico histopatológico de infección gástrica con *Helicobacter* spp. También se estudió por histopatología y por PCR la presencia de *Helicobacter* spp. en los perros de estas personas y luego se determinaron las especies de *Helicobacter* presentes en ambos. En las muestras gástricas de los humanos la única especie encontrada fue *H. pylori*, mientras que en las de los perros se encontraron *H. bizzozeronii* predominantemente, *H. felis*, *H. salomonis* y *H. heilmannii* y en algunos casos varias de estas especies cohabitando el estómago de los perros. En este trabajo no se encontraron las mismas especies en los perros y en sus propietarios.

### PALABRAS CLAVE

*Helicobacter*, estómago, perro, humano, especies.

## ABSTRACT

*Helicobacter* is a genus of Gram-negative bacteria that colonizes the stomach of humans and dogs, among other mammals. The most frequent species found in the gastric mucosa of man is *H. pylori*, involved in the pathogenesis of chronic gastritis, gastric ulcers and neoplasms. However, there are other species of *Helicobacter* in the stomach of humans, such as *H. suis*, *H. bizzozeronii*, *H. felis*, *H. salomonis* and *H. heilmannii sensu stricto*, named non *H. pylori Helicobacter* (NHPH). The dog has a high prevalence of infection of its gastric mucosa with these species of NHPH, *H. felis*, *H. bizzozeronii*, *H. salomonis*, *H. cynogastricus* and *H. heilmannii sensu stricto* and it is common the infection by two or more species. Nevertheless, *H. pylori* does not naturally infect them. The detection of NHPH in the stomach mucosa of humans with gastric disease, and in a high percentage of dogs, suggests the possibility that these animals play an important role in the pathogenesis and transmission of infection to man, postulating the path of transmission oral-oral or fecal-oral. Although there are studies in different geographical areas of the world about NHPH species, both in humans and dogs, and some isolated reports of human cases infected with NHPH that motivated the search of these species in their dogs. There are not investigations that describe a planned study that relates the presence of these species to a significant number of humans and their dogs. The aim of this study was to determine whether people with signs of chronic gastritis who have *Helicobacter* spp. and who own dogs as pets, share the same species with them. The presence of *Helicobacter* spp. in gastric samples of 30 people with clinical signs of chronic gastritis and histopathological diagnosis of gastric infection with *Helicobacter* spp. was analyzed by PCR. The presence of *Helicobacter* spp. was also studied by histopathology and PCR in the dogs of these people. Then, the species of *Helicobacter* presented was determined in both. In human gastric samples, *H. pylori* was the only species found, while in dogs samples were predominantly *H. bizzozeronii*, *H. felis*, *H. salomonis* and *H. heilmannii* and in some cases several of these cohabiting species. In this work the same species were not found in dogs and their owners.

## KEY WORDS

*Helicobacter*, stomach, dog, human, species.

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

## INTRODUCCIÓN

### 1- EL GÉNERO *Helicobacter*

#### 1.1- ESPECIES

##### 1.1.1- *Helicobacter pylori*

##### 1.1.1.1- Características morfológicas, bioquímicas y microbiológicas:

*H. pylori* es un bacilo Gram negativo con forma de s o de barra curvada. Tiene de 1 a 3 vueltas y mide de 2,4 a 4,0  $\mu\text{m}$  de largo y de 0,5 a 1,0  $\mu\text{m}$  de ancho. Tiene extremos romos, y en uno de ellos presenta de 2 a 6 flagelos protegidos por una vaina de estructura lipídica, que le permiten soportar las contracciones del estómago y le dan la motilidad para penetrar en la mucosa gástrica (Goodwin *et al.*, 1985; Jones *et al.*, 1985; Geis *et al.*, 1989).

Es microaerófilico, requiere oxígeno a una baja concentración. Necesita para crecer una atmósfera con 5-10% de  $\text{O}_2$ , 5-10% de  $\text{CO}_2$ , 80-90%  $\text{N}_2$ , temperatura de 37°C y humedad de 90-95%. Puede crecer en distintos medios de cultivo, no selectivos como agar infusión cerebro-corazón, tripticosa soja, agar Mueller-Hinton, agar Columbia o agar *Brucella*, o selectivos como los de Skirrow o Dent. Además requiere de factores de crecimiento y de inhibidores que eviten el sobrecrecimiento de contaminantes que pueden estar presentes en las biopsias. Los suplementos más comúnmente empleados son la sangre o derivados de ella y como inhibidores, la vancomicina, sulfametoxazol, trimetoprim, anfotericina B y polimixina B. Los cultivos crecen después de 3 a 5 días en un medio con pH 6.9-8.0, aunque se recomienda que el período de incubación sea al menos de 10 días. Las colonias son pequeñas, circulares (1-2 mm de diámetro) grisáceas y traslúcidas, con una ligera hemólisis alrededor (Alarcón *et al.*, 1994).

##### 1.1.1.2- Factores de virulencia:

*H. pylori* posee una serie de factores de virulencia que le permiten persistir en el ambiente gástrico (Atherton, 1997 a). La forma espiralada y la presencia de flagelos le permite penetrar en la capa de mucus del estómago, donde queda suspendida, o se adhiere a las células epiteliales mediante la producción de proteínas fijantes llamadas adhesinas (Smoot *et al.*, 1993). Además es productora de ureasa, enzima que hidroliza la urea secretada a nivel de los espacios intercelulares de la mucosa gástrica, transformándola en amoníaco ( $\text{NH}_4$ ) y en dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), que le permite crear una cubierta alcalina a su alrededor para sobrevivir en el medio ácido del estómago y alcanzar la superficie de las células de la mucosa, donde el pH es prácticamente neutro (Marshall, 1988). Esta enzima se localiza principalmente en el citoplasma, pero también se asocia con la superficie de las bacterias (Phadnis *et al.*, 1996; Krishnamurthy *et al.*, 1998; Marcus y Scott, 2001).

La ureasa es tóxica para las células epiteliales gástricas; el  $\text{NH}_4^+$  liberado afecta a la microcirculación y a las células epiteliales superficiales, produce necrosis del tejido profundo, colabora en el desarrollo de gastritis atrófica crónica y facilita la carcinogénesis (Smoot *et al.*, 1990). La bacteria produce también otras enzimas como catalasa y citocromo-oxidasa, superóxido dismutasa, proteinasas y lipasas que le permiten obtener nutrientes, y produce enzimas extracelulares como la fosfolipasa A2 que hidrolizan el moco, reducen su viscosidad y facilitan el movimiento flagelar para desplazarse activamente a través de esa capa (Slomiany *et al.*, 1987).

Otros factores de virulencia como la citotoxina vacuolizante Vac A y el Factor Activador de Plaquetas (PAF), tienen capacidad ulcerogénica (Blaser, 1995; Beswick, 2006). La Interleucina-8 (IL-8) (Crabtree *et al.*, 1995), la proteína HP-PAN (Evans *et al.*, 1995), los lipopolisacáridos (LPS), la citotoxina Cag A (Piotrowski *et al.*, 1995), el antígeno adherido al grupo sanguíneo Bab A y la gama-glutamiltanspeptidasa (Zhang *et al.*, 2015) son otros de los factores que intervienen en la virulencia de *H. pylori*.

#### **1.1.1.3- Hábitat:**

El hombre es el huésped principal de *H. pylori*. La bacteria se ubica casi exclusivamente en la mucosa gastroduodenal, sobre todo a nivel del antro, por debajo de la capa mucosa, donde el pH se aproxima a la neutralidad, sin embargo, también se aísla, aunque con menor frecuencia, de cuerpo y fondo del estómago, y de áreas en que hay metaplasia intestinal o displasia. Asimismo, puede infectar el duodeno y el esófago cuando presentan metaplasia gástrica (Paull y Yardley, 1988), y se ha encontrado en placa dental, heces y sangre (Li *et al.*, 1996; Monteiro *et al.*, 2001; Al Sayed *et al.*, 2014).

#### **1.1.1.4- Epidemiología:**

*H. pylori* es responsable de la infección bacteriana más frecuente y persistente en todo el mundo; se estima que más de la mitad de la población adulta mundial está infectada, y aunque la mayoría de los casos son asintomáticos, es una causa principal de enfermedad del tracto gastrointestinal superior (Dinić *et al.*, 2012). En los países emergentes o en vías de desarrollo, la prevalencia de infección llega al 90%, mientras que en los países desarrollados, con excepción de Japón, la prevalencia es inferior al 40% (Australia 20%; Estados Unidos y Canadá 30%; Suiza 7%) (Taylor y Parsonnet, 1995). La prevalencia global de infección en Latinoamérica es alta, alrededor del 60%, con variaciones entre 30 y 90% (Corti, 2009). Según estudios realizados en países de Europa, Asia y África, más del 90% de los pacientes con úlcera duodenal y del 70% con úlcera gástrica están infectados con *H. pylori*. Sin embargo, sólo entre un 10 a 15% de los individuos infectados sufren de úlcera péptica y hasta un 1 a 3% desarrollan cáncer gástrico; *H. pylori* es responsable del 75%

de los casos de cáncer gástrico. Aproximadamente un 10-20% de la población se infecta de forma crónica, ya que una vez adquirida la infección, persiste por lo general de por vida, a menos que se realice la terapia antimicrobiana de erradicación (Tijjani y Umar, 2008; de Martel *et al.*, 2012). En el año 2012 la fracción atribuible (FA) mundial a la infección por *H. pylori* en el cáncer gástrico fue del 89% y varió según el país, desde menos del 5% en EE. UU., Canadá, Australia, Nueva Zelanda y algunos países del oeste y el norte de Europa, hasta más del 50% en algunos países del África subsahariana (Plummer *et al.*, 2015).

Los factores ambientales y genéticos parecen ser importantes en la progresión de gastritis a formas más graves. Las prácticas de higiene y la dieta también pueden desempeñar un papel importante en la adquisición de la infección y la expresión de la enfermedad clínica (Fallone, 1999).

#### **1.1.1.5- Transmisión:**

La vía de transmisión es desconocida, pero la mayoría de las personas adquieren la infección durante la infancia (Fiedorek *et al.*, 1991; Suerbaum *et al.*, 1998). El modo más probable de transmisión es de persona a persona (Suerbaum y Michetti, 2002), por vía oral-oral o fecal-oral, aunque también podría adquirirse a través del agua (Bellack *et al.*, 2006).

La vía de transmisión de persona a persona es apoyada por la mayor incidencia de la infección en personas institucionalizadas (Harris *et al.*, 1995; Lambert *et al.*, 1995; Bohmer *et al.*, 1997; De Hert *et al.*, 1997; Lewindon *et al.*, 1997), en integrantes de una misma familia (Drumm *et al.*, 1990; Mitchell *et al.*, 1993; Brenner *et al.*, 1998; Goodman y Correa, 2000) y en los miembros de la pareja (Georgopoulos *et al.*, 1996; Brenner *et al.*, 1999).

La vía oral-oral de transmisión se plantea como la hipótesis más probable, ya que se ha detectado ADN de *H. pylori* en saliva, placa dental, jugo gástrico y vómito (Li *et al.*, 1995; Mattana *et al.*, 1998). Otra vía posible de transmisión de *H. pylori* es la fecal-oral, ya que se ha encontrado ADN de *H. pylori* en las heces de personas con infección gástrica (Gramley *et al.*, 1999) y varios investigadores lograron el aislamiento de *H. pylori* en heces a través del cultivo (Thomas *et al.*, 1992).

El agua puede ser una importante fuente de infección; se ha reportado la presencia de esta bacteria en agua potable, tanto en países en desarrollo, como en países industrializados (Klein *et al.*, 1991). *H. pylori* puede vivir durante varios días en el agua de la canilla en su forma bacilar infecciosa y en el agua de río durante varios meses en su forma cocoide (Aziz *et al.*, 2015).

La transmisión zoonótica o por vectores también se ha propuesto. *H. pylori* sólo se ha aislado de primates no humanos (Dubois *et al.*, 1994) y, en una circunstancia particular, del estómago de gatos (Handt *et al.*, 1994; Fox *et al.*, 1995), pero, además, se ha encontrado ADN de *H. pylori* en la mucosa gástrica de ovinos, por lo cual varios estudios sugieren que las ovejas podrían ser fuente de transmisión de *H. pylori* (Dore *et al.*, 2001). La mosca doméstica también se considera potencial transmisora de la bacteria al actuar como vector mecánico de la infección diseminando la bacteria desde las heces (Grübel *et al.*, 1997).

Otra posible forma de contagio es la infección iatrogénica, a través de los equipos de endoscopia, debido a una inadecuada desinfección de los mismos (Akamatsu *et al.*, 1996).

#### **1.1.1.6- Patología:**

La infección por *H. pylori* produce gastritis, úlcera gástrica, y cáncer gástrico y duodenal (Marshall y Warren, 1984; Parsonnet *et al.*, 1991; NIH Consensus Conference 1994; Parsonnet *et al.*, 1994; Lee, 1996; Méndez-Tenorio *et al.*, 2014). También se ha asociado con el desarrollo de linfomas gástricos no Hodgkin (Parsonnet *et al.*, 1994) y con otro trastorno linfoproliferativo del tejido linfoide asociado a la mucosa gástrica (MALT) (Eidt *et al.*, 1994). En el año 1994 *H. pylori* fue clasificado como agente carcinógeno para el cáncer gástrico humano por la Agencia Internacional de Investigación para el Cáncer, perteneciente a la Organización Mundial de la Salud. Al comienzo de la infección se produce una gastritis de tipo B, multifocal y especialmente de antro, con infiltrado de neutrófilos en la lámina propia, que puede llegar hasta el epitelio. En infecciones masivas puede haber disminución del moco, zonas de erosión epitelial y parches de mucosa necrosada. La colonización permanente de la mucosa gástrica por *H. pylori* causa una inflamación con un infiltrado en el que predominan los neutrófilos, pero también los linfocitos y células plasmáticas, dando lugar a una gastritis crónica activa. Esta puede permanecer como una infección crónica durante el resto de la vida o, al cabo de algunos años desarrollar una úlcera péptica o una gastritis atrófica antral que puede evolucionar al cáncer gástrico (Suerbaum, 2002). En ocasiones no se encuentran lesiones, a pesar de que se observan abundantes bacilos en la superficie epitelial (Hazell *et al.*, 1986).

#### **1.1.1.7- Signos clínicos:**

La sintomatología asociada a la gastritis por *H. pylori* es muy variable. En algunos pacientes la enfermedad es casi asintomática, mientras que en otros hay signos digestivos de gravedad variable. En algunos casos, se presentan síntomas de gastritis aguda transitoria (dolor epigástrico, sensación de plenitud, náuseas y vómitos), aunque en general, la bacteria infecta en forma crónica el estómago y produce epigastralgia, que disminuye con la ingesta de alimentos y antiácidos. No

es un dolor constante, sino que alterna con períodos de disminución de molestias, y aumenta antes de las comidas. Puede haber vómitos, anorexia, adelgazamiento, y aunque no es frecuente, hemorragia digestiva (Suerbaum *et al.*, 1998; Graham *et al.*, 2004).

#### **1.1.1.8- Diagnóstico:**

Para el diagnóstico de la presencia de *Helicobacter* spp. existen pruebas no invasivas, y pruebas invasivas que requieren de una muestra de biopsia obtenida mediante endoscopia.

##### **1.1.1.8.1- Métodos no invasivos**

###### **1.1.1.8.1.1- Prueba del aliento:**

La prueba del aliento con urea marcada con  $^{13}\text{C}$  o  $^{14}\text{C}$ , es una prueba no invasiva, no cuantitativa, que detecta en forma indirecta la ureasa producida por *H. pylori*. Consiste en administrar al paciente una dosis oral de urea marcada, que es hidrolizada en el estómago por la ureasa de la bacteria, liberando  $\text{CO}_2$  marcado que se absorbe y difunde a sangre y es transportado a los pulmones y liberado con el aliento. Esta prueba tiene 100% de sensibilidad y 95% de especificidad e indica infección actual, ya que en una infección pasada no hay bacterias que produzcan ureasa. Puede haber falsos negativos en los casos en que hay muy pocas bacterias para producir ureasa detectable, y puede haber falsos positivos en personas infectadas por otras bacterias productoras de ureasa (Peng *et al.*, 2001).

##### **1.1.1.8.2- Métodos invasivos**

###### **1.1.1.8.2.1- Prueba rápida de la ureasa:**

La prueba rápida de la ureasa es una técnica cualitativa, sencilla, rápida y de bajo costo, que determina la actividad de la enzima ureasa en una muestra de mucosa gástrica sumergida en un medio con urea y con rojo de fenol como indicador de pH. La urea, al ser desdoblada por la ureasa, se convierte en amoníaco, por lo cual el pH se eleva y se produce un cambio de color del medio. La sensibilidad es alta y varía entre 80 y 100% y la especificidad varía entre 97 a 99%. Otras bacterias productoras de ureasa en el estómago pueden dar falsos positivos, mientras que la distribución de estas bacterias en parches o las especies de *Helicobacter* ureasa negativas pueden dar falsos negativos (Calvet *et al.*, 2009).

###### **1.1.1.8.2.2- Citología:**

La impronta de biopsia gástrica (citología por contacto) teñida con Gram o tinción de Diff Quik es una técnica simple, rápida y sensible para el diagnóstico de la infección. Sin embargo, no pueden evaluarse las alteraciones concurrentes de la mucosa (Debongnie *et al.*, 1995).

#### 1.1.1.8.2.3- Examen histológico:

La histopatología es la prueba de oro para el diagnóstico de la infección por *H. pylori*. Se basa en la identificación de la bacteria en secciones de tejido de biopsia gástrica teñidas (Marshall y Warren, 1984), que se observa como un bacilo curvo o en forma de espiral, en la superficie epitelial, en la capa de moco y dentro de las glándulas gástricas. Este estudio permite, además, determinar la densidad de colonización bacteriana y brinda información importante acerca de la mucosa (inflamación, atrofia glandular, metaplasia intestinal, displasia, neoplasia). Tiene una sensibilidad de 93-99% y una especificidad de 95-99%, aunque puede disminuir la sensibilidad por la baja densidad de microorganismos y por su distribución irregular en el estómago (Faigel *et al.*, 1996). Las muestras se toman del antro y del cuerpo del estómago, de 5 sitios, según el sistema de clasificación de Sydney actualizado. Se evalúan muestras de diferentes áreas del estómago debido a la distribución irregular de las bacterias en la mucosa gástrica (Dixon *et al.*, 1996). La coloración de Giemsa es la que más se utiliza, ya que es técnicamente simple, altamente sensible y económica; la tinción con hematoxilina y eosina (H/E) también permite detectar la bacteria, pero cuando los resultados no son concluyentes se pueden utilizar tinciones especiales, como Warthin-Starry con nitrato de plata, Azul de toluidina, Naranja de acridina, McMullen, Genta, Dieterle y Romanowsky. Se pueden utilizar 2 tinciones diferentes, Giemsa para la detección de *H. pylori* y H/E para evaluar células inflamatorias (Laine *et al.*, 1997).

#### 1.1.1.8.2.4- Serología:

Consiste en la detección de anticuerpos de tipo IgG anti-*H. pylori* en suero mediante un análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Es una prueba no cuantitativa, rápida y relativamente económica, útil para el diagnóstico inicial de la infección. Tiene una sensibilidad y especificidad de 60-100%. La principal desventaja es que no puede diferenciar la infección activa de la exposición previa al microorganismo, y que el antígeno utilizado deriva de una sola cepa de *H. pylori* (Hook-Nikanne, 1997). La seroconversión ocurre varios meses después de la infección (Nurgalieva *et al.*, 2006), este lapso de tiempo entre la infección y la seroconversión sirve para definir las fases de infección: aguda antes de la seroconversión, o crónica después de la seroconversión (Nurgalieva *et al.*, 2005). La serología no se usa inmediatamente después del tratamiento, ya que los títulos de anticuerpos demoran varios meses en caer (Atherton, 1997 b).

#### 1.1.1.8.2.5- Cultivo microbiológico:

Es el método de referencia (prueba de oro) para el diagnóstico de la infección, pero no es un método de diagnóstico de rutina. Si bien el cultivo de la biopsia tiene una especificidad del 100%, no es 100% sensible (> 90%), ya que con este método se puede evaluar sólo una parte

relativamente pequeña del estómago. Debido a los exigentes requerimientos de esta bacteria para el cultivo, la principal desventaja de esta técnica es que puede disminuir la sensibilidad cuando las condiciones no son óptimas. Por otra parte, dada la colonización en parches de *H. pylori* en la mucosa gástrica, puede haber resultados falsos negativos si no hay bacterias en la muestra tomada (Hirschl y Makristathis, 2007).

#### **1.1.1.8.2.6- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):**

La PCR es una técnica muy sensible, que detecta mínimas concentraciones de ADN de *H. pylori* en biopsias gástricas, pero no permite confirmar su viabilidad, ni su capacidad para producir la infección (Brooks *et al.*, 2004). Se pueden amplificar diferentes genes, algunos específicos de la bacteria y otros relacionados a los factores de virulencia (Clayton *et al.*, 1991; De Reuse *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 1999; Chisholm *et al.*, 2002; Yamazaki *et al.*, 2005). Esta técnica tiene un 100 % de sensibilidad, y no requiere de microorganismos vivos para detectar la infección, siendo suficientes los fragmentos de la bacteria para su reconocimiento. El principal inconveniente de esta técnica es que puede dar resultados falsos negativos, debido a la presencia de restos de tejido gástrico que pueden inhibir la reacción de la PCR, o a la ausencia de bacterias en la muestra obtenida, dado la colonización en parches de la mucosa gástrica (Lottspeich *et al.*, 2007).

Lu *et al.* (1999) evaluaron cinco PCRs diferentes para la detección de *H. pylori* en muestras de biopsia gástrica de pacientes con dolor abdominal y compararon la sensibilidad y especificidad: Ho *et al.* (1991) basada en el gen *16S ARNr*, Valentine *et al.* (1991) basada en secuencias cromosómicas al azar, Clayton *et al.* (1992) basada en el gen *ureA*, Hammer *et al.* (1992) basada en el antígeno especie específico 26-kDa SSA y Bickley *et al.* (1993) basada en el gen *glmM*. La PCR descrita por Bickley *et al.* (1993) en la cual las secuencias del par de cebadores dentro del gen *ureC* son conservados en la mayoría de las cepas, resultó ser la más sensible y específica para la detección de *H. pylori* en muestras de biopsia gástrica.

#### **1.1.1.8.2.7- Hibridación fluorescente *in situ* (FISH):**

La FISH es un método que permite detectar la infección en biopsias gástricas mediante sondas de hibridación fluorescentes que se unen al *16S ARNr* de *H. pylori*. Se ha reportado hasta un 98% de sensibilidad y un 100% de especificidad en la detección de la bacteria con esta técnica, pero no es utilizada en la práctica clínica por su costo elevado (Samarbaf-Zadeh *et al.*, 2007).

#### **1.1.1.8.2.8- Identificación de antígeno fecal:**

La prueba de antígeno fecal es un test inmunoenzimático que permite la detección de antígeno de *H. pylori* en muestras de heces, utilizando anticuerpos monoclonales anti-*H. pylori*. Es un método

cualitativo, no invasivo, que tiene una excelente sensibilidad y especificidad en comparación con las pruebas diagnósticas más invasivas (Makristathis *et al.*, 2000). Es útil para establecer el diagnóstico inicial, verificar la eficacia del tratamiento en las cuatro o seis semanas posteriores a su realización y comprobar la reaparición de una infección (Shaikh *et al.*, 2005).

#### **1.1.1.9- Tratamiento:**

Para la erradicación de *H. pylori* se realizan tratamientos cuádruples, con una extensión de la duración hasta los 14 días y la administración de un potente supresor del ácido gástrico para maximizar la eficacia de los antibióticos. El subcitrato de bismuto, adicionado a regímenes triples con inhibidores de la bomba de protones (IBP), amoxicilina y otro antibiótico como claritromicina, metronidazol, levofloxacina o rifabutina, es efectivo y aumenta las tasas de curación por encima del 90%, aunque el vonoprazán, un potente antisecretores que inhibe la unión del potasio a la bomba de protones (H-K-ATPasa) en la célula parietal gástrica, es significativamente superior a los IBP. La combinación de bismuto, IBP y dos antibióticos (incluyendo amoxicilina, metronidazol, tetraciclina o furazolidona), resulta un tratamiento altamente eficaz frente a cepas multirresistentes de *H. pylori* (Molina-Infante *et al.*, 2017).

#### **1.1.2- Otras especies de *Helicobacter* que infectan el estómago del hombre y del perro**

Existen otras bacterias del género *Helicobacter*, de forma espiralada, más grandes, y con una morfología diferente a *H. pylori*, denominadas actualmente *Helicobacter* no *H. pylori* (NHPH), que colonizan comúnmente el estómago de los perros, y algunas, el estómago de los humanos. Estas bacterias son *H. heilmannii sensu stricto* (s.s.), *H. suis*, *H. bizzozeronii*, *H. felis*, *H. salomonis* y *H. cynogastricus*. *H. baculiformis* también forma parte de este grupo, pero hasta el momento sólo se ha encontrado en la mucosa gástrica del gato (Lee *et al.*, 1988; Hänninen *et al.*, 1996; Jalava *et al.*, 1997; Jalava *et al.*, 2001; Hwang *et al.*, 2002; Van den Bulck *et al.*, 2006; Baele *et al.*, 2008 a; Baele *et al.*, 2008 b; Smet *et al.*, 2013).

Estas bacterias fueron descritas por primera vez en 1987, encontradas en biopsias gástricas de pacientes humanos (Dent *et al.*, 1987) y fueron llamadas “*Gastrospirillum hominis*” (McNulty *et al.*, 1989) por su ubicación en el estómago del hombre. Este hallazgo fue confirmado rápidamente por numerosos informes de casos que describían organismos similares en un pequeño número de pacientes (Dye *et al.*, 1989; Figura *et al.*, 1990; Fischer y Samisch 1990; Fléjou *et al.*, 1990; Morris *et al.*, 1990; Ierardi *et al.*, 1991; Borody *et al.*, 1992; Al-Himyary *et al.*, 1994; Akin *et al.*, 1995; Hilzenrat *et al.*, 1995; Monno *et al.*, 1995; Drewitz *et al.*, 1997). Luego, por análisis moleculares fueron clasificadas dentro del género *Helicobacter* y fueron denominadas “*H. heilmannii*” (Heilmann y Borchard, 1991).

Durante mucho tiempo, a estas bacterias que se encontraban en la mucosa gástrica del hombre, se las denominó “*H. heilmannii*” o “*H. heilmannii*-like organisms”. Pero, a través del análisis de secuencias de los genes que codifican para el 16S ARNr y 23S ARNr se supo que las bacterias llamadas “*H. heilmannii*” comprendían varias especies que diferían entre sí en más del 3% de las secuencias de nucleótidos, por lo cual se las subclasificó como “*H. heilmannii*” tipo 1 y “*H. heilmannii*” tipo 2 (Dewhirst *et al.*, 2005). “*H. heilmannii*” tipo 1 corresponde al actual *H. suis* (Baele *et al.*, 2008 a), y “*H. heilmannii*” tipo 2 incluye a un grupo de especies: *H. felis*, *H. bizzozeronii*, *H. salomonis* y *H. heilmannii* s.s. que se encuentran en el estómago de humanos y perros. *H. cynogastricus* encontrado en el perro, y *H. baculiformis*, en el gato, también forman parte de este grupo, pero no se han encontrado aún en humanos (Van den Bulck *et al.*, 2006; Baele *et al.*, 2008 b). Luego, para evitar confusiones, se propuso mencionarlas como *H. heilmannii sensu lato* (s.l.) a todas las especies del grupo reconocidas por su morfología, y *H. heilmannii* s.s. cuando se identifica como tal a nivel de especie mediante técnicas moleculares. Actualmente, para mencionar a estas bacterias cuando son identificadas por su morfología y no a nivel de especie, se utiliza el término *Helicobacter* no *H. pylori* “non-*H. pylori Helicobacter*” (NHPH) (Haesebrouck *et al.*, 2009).

Las especies de *Helicobacter* son las únicas bacterias que infectan el estómago humano, con la excepción de la colonización ocasional transitoria por bacterias entéricas, aunque Lee *et al.* (1997) cultivaron de biopsias gástricas de pacientes de Korea un organismo cocoide ureasa positivo, el *Staphylococcus saprophyticus*.

#### **1.1.2.1- Características morfológicas:**

##### ***Helicobacter heilmannii***

*H. heilmannii* tiene forma helicoidal, es fuertemente espiralada (4 a 8 espirales) y no tiene fibrilos periplásmicos. Tiene 6 a 12 flagelos en cada polo. Mide de 3,5 a 7,5 µm de largo y 0,5 a 0,9 µm de diámetro. Es parecido a *H. felis*, pero sin fibrilos periplásmicos (Hänninen *et al.*, 1996; O’Rourke *et al.*, 2004; Baele *et al.*, 2008 b).

##### ***Helicobacter bizzozeronii***

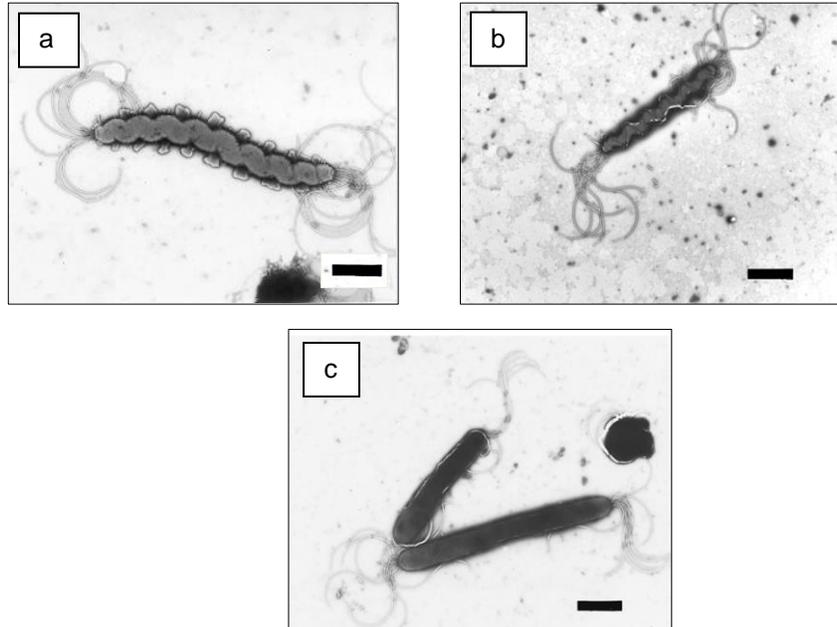
*H. bizzozeronii* tiene forma espiralada muy cerrada, con 3 a 8 espirales, no tiene fibrilos periplásmicos y posee entre 10 a 20 flagelos envainados en ambos extremos, ubicados ligeramente fuera del centro. Mide de 5 a 10 µm de largo por 0,3 µm de ancho (Hänninen *et al.*, 1996; O’Rourke *et al.*, 2004; Baele *et al.*, 2008 b) (Figura 1).

***Helicobacter felis***

*H. felis* tiene forma helicoidal, con un complejo de bobinas fuertemente enrolladas y con fibrilos periplásmicos dispuestos de a pares, enrollados alrededor del cuerpo del microorganismo. En cada extremo tiene flagelos posicionados ligeramente fuera del centro (Lee *et al.*, 1988) (Figura 1).

***Helicobacter salomonis***

*H. salomonis* tiene forma espiralada, pero menos cerrada, con espirales más sueltas, de 5 a 7  $\mu\text{m}$  de largo por 0,8 a 1,2  $\mu\text{m}$  de ancho, y no tiene fibrilos periplásmicos. Tiene de 10 a 23 flagelos enfundados, en uno o en ambos extremos; el movimiento es más lento que el de *H. felis* o *H. bizzozeronii* (Jalava *et al.*, 1997) (Figura 1).



**Figura 1:** Microfotografía electrónica de transmisión de *H. bizzozeronii* (a), *H. felis* (b), y *H. salomonis* (c), (7.000X, barra 2,3  $\mu\text{m}$ ), (Jalava, 1998).

***Helicobacter cynogastricus***

*H. cynogastricus* tiene forma espiralada, cerrada, y tiene un fibrilo periplásmico a lo largo del lado externo de la hélice (Van den Bulck *et al.*, 2006).

***Helicobacter suis***

*H. suis* tiene forma espiralada, con seis vueltas fuertemente enrolladas. Mide 2,3-6,7  $\mu\text{m}$  de largo y 0,9-1,2  $\mu\text{m}$  de ancho aproximadamente. No tiene fibrilos periplásmicos. En el cultivo predominan

las formas cocoides. Tiene en ambos extremos mechones de 4 a 10 flagelos envueltos, de extremos romos, aunque algunos terminan en forma esférica.

*H. heilmannii*, *H. bizzozeronii* y *H. suis* son morfológicamente muy similares (Hänninen *et al.*, 1996; O'Rourke *et al.*, 2004; Baele *et al.*, 2008 b).

#### **1.1.2.2- Especies predominantes:**

En humanos, la especie de NHPH más prevalente es *H. suis*, con una secuencia igual a la de *H. suis* que habita en el estómago del cerdo (De Groote *et al.*, 2005; Van den Bulck *et al.*, 2005 a; Haesebrouck *et al.*, 2009). También es frecuente el hallazgo de *H. salomonis* en las biopsias gástricas humanas, a diferencia de lo que sucede en el perro, donde no es común encontrarlo. En cambio, la infección con *H. felis* ha sido reportada raramente, aparentemente como una zoonosis por investigadores franceses (Lavelle *et al.*, 1994; Germani *et al.*, 1997), aunque en un estudio realizado sobre 90 personas de origen africano, *H. felis* se encontró en un 25,6% (Lekunze Fritz *et al.*, 2006), y en otro estudio realizado por Yakob *et al.* (2012) sobre 250 pacientes paquistaníes con dispepsia, se encontró un 4% de *H. felis* y un 6% de *H. heilmannii*. Sólo *H. bizzozeronii* y *H. felis* han sido aislados de la mucosa gástrica humana (Andersen *et al.*, 1996; Jalava *et al.*, 2001; Kivistö *et al.*, 2010; Wüppenhorst *et al.*, 2012).

Varios investigadores estudiaron mediante la amplificación del gen *16S ARNr* por PCR, la presencia de especies NHPH en biopsias gástricas con evidencia histológica de infección por estos organismos. Chisholm y Owen (2003) encontraron ADN de “*Candidatus H. heilmannii*”, De Groote *et al.* (2005) detectaron ADN de *H. suis* y de “*Candidatus H. bovis*”, Van den Bulck *et al.* (2005 a) ADN de *H. suis*, de *H. salomonis*, de *H. felis*, de “*Candidatus H. heilmannii*” y de *H. bizzozeronii* usando una PCR múltiple.

En un estudio realizado en Bélgica por Van den Bulck *et al.* (2005 a) sobre 123 biopsias de humanos infectados con especies NHPH, *H. suis* fue detectado en 36.6%, *H. salomonis* en 21%, *H. felis* en 15% y *H. bizzozeronii* en 8%.

En perros, las especies identificadas son *H. bizzozeronii* (Hänninen *et al.*, 1996), *H. felis* (Lee *et al.*, 1988), *H. salomonis* (Jalava *et al.*, 1997), *H. cynogastricus* (Van den Bulck *et al.*, 2006) y *H. heilmannii* s.s. (Smet *et al.*, 2013) y son comunes las infecciones mixtas, con varias especies presentes en forma conjunta.

*H. bizzozeronii* es la especie que predomina en la mucosa gástrica del perro, en cambio, *H. salomonis* se encuentra en forma esporádica (Baele *et al.*, 2004; Priestnall *et al.*, 2004; Van den Bulck *et al.*, 2005 a; Amorim *et al.*, 2015). En perros de Bélgica, Van den Bulck *et al.* (2005 a)

documentaron que *H. bizzozeronii* fue la especie más prevalente, ya que se identificó en el 20% de los perros como único agente y en el 50% de los perros como infecciones mixtas. Infecciones con *H. felis* como única especie se encontraron esporádicamente, mientras que infecciones únicas con *H. salomonis* no se identificaron en ninguna muestra.

En un estudio realizado por Van den Bulck *et al.* (2005 a), se encontró *H. felis* en más del 50% de los perros y gatos belgas investigados, pero otros grupos de investigadores encontraron *H. felis* en pocos estómagos caninos (Neiger *et al.*, 1998; Strauss-Ayali *et al.*, 2001; Hwang *et al.*, 2002; Priestnall *et al.*, 2004; Wiinberg *et al.*, 2005). La prevalencia en perros de “*Candidatus H. heilmannii*” varió entre 20 y 100% según diferentes estudios. No hay aún estudios hechos sobre la prevalencia de *H. cynogastricus* en perros (Neiger *et al.*, 1998; Strauss-Ayali *et al.*, 2001; Hwang *et al.*, 2002; Priestnall *et al.*, 2004; Wiinberg *et al.*, 2005).

Neiger *et al.* (1998) encontraron que el 89% de las muestras estudiadas fueron positivas a *Helicobacter* spp.; *H. bizzozeronii* fue identificado en el 31% de las mismas, *H. heilmannii* en el 21%, *H. felis* en el 10% y hubo infección doble en un 10% de los casos. Hwang *et al.* (2002) en Corea, encontraron mediante PCR, una prevalencia de *Helicobacter* spp. de 82,3%, donde 76,2% de las muestras fueron positivas a *H. heilmannii*, 4,8% a *H. felis* y 19% fueron negativas para las PCRs específicas de especie. Baele *et al.* (2004) realizaron una PCR para identificar *H. felis*, *H. bizzozeronii* y *H. salomonis* (BSF-PCR) en biopsias gástricas de perros en Bélgica, y encontraron que 58,8% fueron positivas a *H. bizzozeronii*, 5,9% a *H. felis* y 11,8% tenían una infección mixta de *H. bizzozeronii* y *H. felis*. Priestnall *et al.* (2004) evaluaron biopsias gástricas de perros de Dinamarca, el 40% estuvo infectado con “*H. heilmannii*” solamente, el 60% tuvo coinfección con “*H. heilmannii*” y *H. bizzozeronii* y no hubo infectados con *H. felis*. Van den Bulck *et al.* (2005 a) estudiaron muestras de perros en Bélgica, identificando a *H. bizzozeronii* en el 70% de las mismas y a *H. felis* en el 3,6%. En el 37,3% de las muestras se detectaron infecciones mixtas, mientras que en el 27,3% se encontró una sola especie.; *H. bizzozeronii* en el 20% como infección única; *H. bizzozeronii* más *H. felis* en 20,9%; *H. bizzozeronii* más una especie no identificada (HLO135) en 4,5%; *H. felis* más HLO135 en 5,4%; *H. bizzozeronii* más *H. salomonis* en 1,8%; *H. bizzozeronii* más *H. felis* más *H. salomonis* en 5,4%; *H. bizzozeronii* más *H. felis* más *H. salomonis* más HLO135 en 1,8%; *H. bizzozeronii* más *H. felis* más HLO135 en 15,5%. Las infecciones únicas con *H. felis* fueron esporádicas y no hubo infecciones únicas con *H. salomonis*. Wiinberg *et al.* (2005) analizaron muestras gástricas de perros en Dinamarca, e identificaron a *H. bizzozeronii*, *H. heilmannii*, y *H. felis* en 65,2%, 39,1%, y 8,7% de los perros infectados, respectivamente y encontraron coinfección en 16,7% de los perros, la mayoría infectados con una combinación de *H. heilmannii* y *H. bizzozeronii*, excepto 1 perro, que fue infectado con *H. bizzozeronii* y *H. felis*. Ninguno fue infectado con *H. pylori*. Por otra parte Amorim *et al.* (2015) analizaron muestras

gástricas de perros en Portugal y encontraron diferencias en la prevalencia de especies de *Helicobacter* según las regiones del estómago, los organismos *H. heilmannii-like* fueron los más comúnmente encontrados, identificados en el 66,7% de los animales, predominantemente en la región antral gástrica. *H. salomonis* fue la segunda especie más prevalente (51,5%), pero se encontró principalmente en la región del cuerpo y en asociación con otras especies de *Helicobacter* (42%). *H. bizzozeronii* y *H. felis* se detectaron con menos frecuencia y en iguales proporciones (18,2%), tanto como infección única (6,3%) como mixta (12,1%). Las infecciones mixtas con *H. heilmannii-like* y *H. salomonis* fueron los más frecuentes (33,3%). La mayoría de las muestras fueron positivas en la PCR específica para *H. heilmannii*, sin embargo, los amplicones mostraron un 92% de homología con *H. heilmannii* s.s., por lo tanto, estos casos fueron reclasificados como *H. heilmannii-like*. En el 51,5% de las muestras positivas se identificó una única especie de *Helicobacter*, mientras que en el 48,5% las infecciones fueron mixtas.

Si bien hay consenso en que *H. pylori* no infecta de forma natural al perro (Henry *et al.*, 1987; Geyer *et al.*, 1993; Hermanns *et al.*, 1995; Ekman *et al.*, 2013; Arfaee *et al.*, 2014), Buczolits *et al.* (2003) en Austria, reportaron la identificación de dos secuencias de bacterias NHPH en la mucosa gástrica de cuatro perros 100% idénticas a *H. pylori*, y Astudillo Vergara (2009) en Chile y Ülgen *et al.* (2016) en Turquía, comunicaron el hallazgo de esta especie en unos pocos perros.

### **1.1.2.3- Factores de virulencia de especies NHPH:**

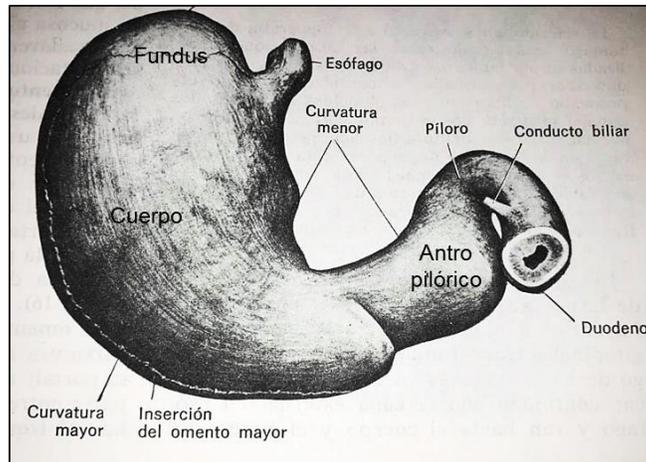
Todas las especies gástricas de *Helicobacter* tienen genes productores de ureasa, enzima que se localiza principalmente en el citoplasma de las bacterias, pero también en su superficie, y que constituye un mecanismo importante de supervivencia al crear un microambiente neutro a su alrededor (Krishnamurthy *et al.*, 1998; Marcus y Scott, 2001). Esta enzima tiene dos subunidades, *ureA* y *UreB*; en *H. felis*, se ha detectado un segundo sistema de ureasa, *UreA2B2*, pero se desconoce su función y regulación (Pot *et al.*, 2007). Poseen de 2 a 23 flagelos que les permite moverse hacia la mucosa gástrica facilitándoles la colonización del estómago (Josenhans *et al.*, 1999). Las especies NHPH carecen de las adhesinas que posee *H. pylori*, aunque recientemente, Liu *et al.* (2016) identificaron unas proteínas de membrana externa (*HofE* y *HofF*) en *H. heilmannii* como adhesinas implicadas en la unión a las células epiteliales de la mucosa gástrica. Estas especies producen también gamma-glutamiltanspeptidasa (GGT), involucrada en la muerte de células epiteliales gástricas y en la inhibición de la proliferación de linfocitos T. Además, convierten la glutamina (Gln) y el glutati6n (GSH) en glutamato, lo que da lugar al agotamiento de estos dos compuestos, que puede conducir al desarrollo de patologías gástricas (Kim *et al.*, 2007; Schmees *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2015). Namburi *et al.* (2016), descubrieron que *H. bizzozeronii* expresa una polisacaridasa, la condroitinasa AC. La secreci6n de condroitina-4-sulfato en el jugo gástrico por las células principales de la mucosa del fondo es una característica única del estómago canino,

por lo que se cree que la expresión de la condroitinasa AC es a consecuencia de la adaptación de esta bacteria a su hospedador.

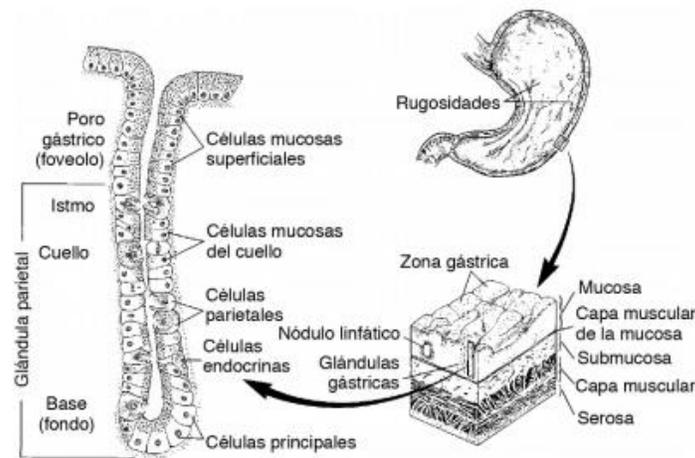
#### 1.1.2.4- Ubicación:

Al examen histológico de las muestras de mucosa gástrica en el hombre, las especies NHPH se encuentran en grupos pequeños, ubicados típicamente en la capa de mucus sobre las células de la superficie epitelial. También pueden encontrarse en la profundidad del lumen de las glándulas gástricas y, en algunos casos, dentro de las células mucosas y parietales y en el interior de los canalículos de las células parietales (Heilmann y Borchard, 1991). Estas especies se encuentran más frecuentemente colonizando el antro gástrico, aunque en el 20% de los casos también colonizan el cuerpo del estómago (Stolte *et al.*, 1997).

En el perro, estas bacterias se encuentran en todas las regiones del estómago, aunque más frecuentemente en el cuerpo y en el fundus, y menos comúnmente en el antro (Figura 2). Se detectan superficialmente sobre la mucosa, en las fosas gástricas, en las glándulas gástricas y en las células parietales (Figura 3). En la región del antro tienen una localización más superficial que en el fundus y cuerpo (Hänninen *et al.*, 1996; Happonen *et al.*, 1996). *H. felis* se encuentra, generalmente, en las proximidades de las células parietales, en aposición de su membrana externa a nivel de los fibrilos periplásmicos con las microvellosidades de la membrana de las células parietales. Esto no sucede con *H. bizzozeronii* (De Bock *et al.*, 2006).



**Figura 2:** Anatomía del estómago del perro (Sisson y Grossman, 1982).



**Figura 3:** Ilustración de las capas del estómago (Cunningham, 2014).

#### 1.1.2.5- Prevalencia:

La prevalencia de infección por especies NHPH en humanos varía entre un 0,2-6% de las biopsias gástricas, dependiendo de la zona geográfica (Dye *et al.*, 1989; McNulty *et al.*, 1989; Fléjou *et al.*, 1990; Morris *et al.*, 1990; Heilmann y Borchard, 1991; Mazzucchelli *et al.*, 1993; Oliva *et al.*, 1993; Hilzenrat *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1995 b; Fenjvesi *et al.*, 1999; Foschini *et al.*, 1999; Honsová *et al.*, 1999; Mention *et al.*, 1999; Svec *et al.*, 2000; Ierardi *et al.*, 2001; Kaklikkaya *et al.*, 2002; Boyanova *et al.*, 2003; Chisholm y Owen, 2003), mientras que *H. pylori* es encontrado en 30 a 100% de las gastroscopías (Stolte *et al.*, 1994). Estas bacterias se han encontrado en una minoría de biopsias gástricas humanas en asociación con gastritis (McNulty *et al.*, 1989; Heilmann y Borchard, 1991; Wegmann *et al.*, 1991). En China y Tailandia se ha informado hasta un 6% (Yali *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998).

La prevalencia de *H. suis* es más alta que la de otras especies NHPH (Van den Bulck *et al.*, 2005 a, b); *H. suis* comprende 13,9% (De Groote *et al.*, 2005) a 30,9% (Van den Bulck *et al.*, 2005 a, b) de las infecciones por especies NHPH en humanos. *H. suis* se detectó en 36,6% de 123 biopsias humanas infectadas con especies NHPH, *H. salomonis* en 21%, *H. felis* en 15% y *H. bizzozeronii* en 8%. A pesar de que *H. bizzozeronii* tiene baja baja prevalencia en biopsias humanas, fue aislada *in vitro* a partir de una biopsia gástrica infectada por especies NHPH (Jalava *et al.*, 2001; Kivistö *et al.*, 2008).

En el perro, las bacterias NHPH se encuentran frecuentemente, siendo casi universal la presencia de estos organismos en su mucosa gástrica. La prevalencia varía entre 67 a 100% en perros

clínicamente sanos (Weber *et al.*, 1958; Henry *et al.*, 1987; Eaton *et al.*, 1996; Happonen *et al.*, 1998; Jalava *et al.*, 1998; Yamasaki *et al.*, 1998; Cattoli *et al.*, 1999; Neiger *et al.*, 1999), y entre 61 a 100% en perros con vómito crónico (Geyer *et al.*, 1993; Hermanns *et al.*, 1995; Cattoli *et al.*, 1999; Diker *et al.*, 2002; Hwang *et al.*, 2002; Van den Bulck *et al.*, 2005 a). En perros de laboratorio y de refugios se encontró un 100% de infección (Henry *et al.*, 1987; Eaton *et al.*, 1996; Simpson y Burrows, 1999).

Weber *et al.* (1958) detectaron bacterias NHPH en todos los perros adultos normales; Henry *et al.* (1987) encontraron una tasa de infección de 100% en beagles de laboratorio y Geyer *et al.* (1993) en Alemania, encontraron una frecuencia de especies NHPH en perros clínicamente enfermos de 73.8 %. Hermanns *et al.* (1995) en Alemania encontraron especies NHPH en 82% de 122 perros examinados, la mayoría con síntomas gastrointestinales.

Eaton *et al.* (1996) en Estados Unidos, evaluaron la prevalencia de las bacterias gástricas mediante histopatología en tres poblaciones diferentes de perros (n=54), encontrando bacterias espiraladas en el 100% de los 39 perros sanos de laboratorio y de refugio, y en el 67% de los 15 perros con diferentes patologías no gástricas.

Por otro lado, Jalava *et al.* (1998) en Bélgica, estudiaron 95 biopsias de mucosa gástrica, 37 de perros clínicamente sanos, 23 de perros con signos gastrointestinales, 18 de perros eutanasiados con estado de salud desconocido y 17 de perros sanos de experimentación, obteniendo mediante cultivo el aislamiento en el 51% de las muestras.

Yamasaki *et al.* (1998) investigaron, mediante histología, la presencia de especies NHPH gástricas en 21 perros sanos y en 56 perros con signos gastrointestinales, encontrándolas en más del 60% de los perros. Reportaron que la prevalencia en perros con signología clínica (86%) no fue significativamente mayor que en los clínicamente sanos (61%).

Cattoli *et al.* (1999) encontraron, a través del estudio citológico de las biopsias gástricas de perros de Italia y de los Países Bajos, 92% (23/25) de los perros positivos a estructuras compatibles con especies NHPH, algunos con signos digestivos y otros clínicamente sanos.

Neiger *et al.* (1999) en Suiza, estudiaron mediante PCR la presencia de especies NHPH en dos grupos de perros, uno formado por 45 perros de compañía llevados al Hospital para procedimientos quirúrgicos de rutina (n = 39) o tratamiento clínico de enfermedad gastrointestinal (n = 6), y el otro grupo formado por 20 perros Beagle clínicamente sanos. 89% de los perros del primer grupo fueron positivos a la presencia de especies NHPH, y el 100% de los del segundo grupo.

Nam y Kim (2000) en Corea, detectaron mediante PCR en el 88,5% de 87 perros la presencia de especies NHPH.

Diker *et al.* (2002) en Turquía, estudiaron los sitios de colonización, la prevalencia y los efectos patológicos de especies NHPH en el estómago de 122 perros eutanasiados por diferentes enfermedades, encontrando la bacteria en el 84,4% de los animales.

Hwang *et al.* (2002) en Corea recuperaron tejido gástrico de 28 perros eutanasiados, 4 con signos gastrointestinales y 24 sin signos, y de 12 perros Beagle de laboratorio clínicamente sanos. La prevalencia de infección determinada por PCR fue del 100% en perros clínicamente anormales, y del 67,5 y 77,5% en perros normales según la zona del estómago estudiada.

Paz Zúñiga (2002), obtuvo una frecuencia de presentación del 100% mediante prueba de la ureasa e histología en un estudio sobre 29 perros de Chile destinados a eutanasia sin historia clínica conocida.

Jara Verdugo (2003) en Chile encontró a través de la histopatología de biopsias gástricas de 34 perros destinados a eutanasia con historia clínica desconocida, una frecuencia de presentación de 94,1%.

Van den Bulck *et al.* (2005 a) en Bélgica encontraron mediante PCR una prevalencia de 71,8% en 110 perros muertos por diferentes patologías.

De Toledo Vieira *et al.* (2012) en Brasil investigaron mediante examen histopatológico la presencia de especies NHPH en la mucosa gástrica de 60 perros eutanasiados sin historia clínica conocida y detectaron la bacteria en el 96,7% de los animales.

Okubo *et al.* (2017) en Brasil estudiaron a través de la prueba de ureasa e histopatología, la presencia de bacterias NHPH en 96 perros eutanasiados sin historia clínica conocida, reportando una prevalencia de 94,7% por la primera técnica y del 100% por la segunda.

#### **1.1.2.6- Transmisión:**

Se presume que estas bacterias se transmiten de animales a humanos por contacto directo; el contacto con animales (perros, gatos, cerdos) se considera un factor de riesgo significativo para estas infecciones (Meining *et al.*, 1998; Svec *et al.*, 2000). La intensidad del contacto con los animales parecería ser importante también, ya que se encontró una mayor incidencia de infección en criadores y personal de mataderos de cerdos, y en personas que tienen contacto con animales de compañía (Stolte *et al.*, 1994; Yoshimura, *et al.*, 2002; Sykora *et al.*, 2003; Van Loon *et al.*,

2003). Se sospecha que la transmisión entre perros sería oral-oral y fecal oral, ya que se ha detectado ADN de *Helicobacter* spp. en la cavidad oral de perros, tanto en saliva como en placa dental y también en heces (Recordati *et al.*, 2007; Sung-Woo Ha *et al.*, 2008). Hänninen *et al.* (1998) describieron la transmisión de *H. salomonis* de una madre a sus cachorros, por lo que se sospecha que la transmisión sería oral-oral u oral gástrico, por el íntimo contacto que tiene la madre con sus cachorros. También se reportó la transmisión entre cachorros infectados y no infectados.

#### **1.1.2.7- Patología:**

La gastritis producida por especies NHPH en los seres humanos, en general, es menos grave que la producida por *H. pylori* (Stolte *et al.*, 1997). Las infecciones con especies NHPH producen, generalmente, una gastritis crónica activa, (Stolte *et al.*, 1997), aunque ocasionalmente producen gastritis aguda (Yoshimura *et al.*, 2002). La inspección de la mucosa gástrica a través de la endoscopia revela una variedad de lesiones que van desde una mucosa normal a ligeramente hiperémica o con edema, hasta múltiples erosiones y ulceraciones, principalmente en el antro gástrico (Stolte *et al.*, 1997; Debongnie *et al.*, 1998; Dieterich *et al.*, 1998; Yoshimura *et al.*, 2002; Boyanova *et al.*, 2003; Seo *et al.*, 2003; Sykora *et al.*, 2003; Van Loon *et al.*, 2003) o en el duodeno (Goddard *et al.*, 1997; Jhala *et al.*, 1999; Schildt *et al.*, 2000). Al examen histológico las bacterias NHPH se encuentran típicamente en la capa de mucus sobre las células de la superficie epitelial, pero también pueden encontrarse en la profundidad del lumen de las glándulas gástricas y dentro de las células parietales. Puede haber atrofia glandular o metaplasia intestinal de la mucosa del fundus, pero estas lesiones son menos comunes en las infecciones por especies NHPH que en las infecciones por *H. pylori* (Stolte *et al.*, 1997). La inflamación gástrica se caracteriza generalmente por exudación linfocítica en las glándulas gástricas, con presencia de células plasmáticas y en algunos casos, se observan agregados de linfocitos. En ocasiones, el moco epitelial está disminuido (Fléjou *et al.*, 1990; Oliva *et al.*, 1993; Morgner *et al.*, 2000; Schildt *et al.*, 2000; Ierardi *et al.*, 2001; Kaklikkaya *et al.*, 2002). Estas infecciones han sido asociadas con linfoma de tejido linfoide asociado a la mucosa gástrica (MALT) de bajo grado, y el riesgo de desarrollar linfoma MALT es más alto con especies NHPH que con *H. pylori* (Morgner *et al.*, 1995; Morgner *et al.*, 2000). Se ha reportado la presentación de carcinoma gástrico con infección con bacterias NHPH (Yang *et al.*, 1995 b). La coinfección por especies NHPH y *H. pylori* no es frecuente; la bibliografía reporta la presencia de bacterias NHPH en un 11,9% de los pacientes infectados con *H. pylori* (Liu *et al.*, 2015).

En el perro, en el estudio endoscópico del estómago con gran número de bacterias se observa la presencia de abundante cantidad de mucus y de zonas hiperémicas (Simpson y Burrows, 1999), aunque Paz Zúñiga (2002), señala que la apariencia endoscópica de la mayoría de los perros no

presenta alteraciones evidentes. Las úlceras gástricas y duodenales no son frecuentes en perros y no se sabe aún si están asociadas a la infección con bacterias NHPH (Bridgeford *et al.*, 2008). Las especies NHPH que habitan en el estómago del perro se han encontrado en muestras gástricas histológicas normales como en otras con alteraciones, no así *H. felis* que sólo se ha encontrado en perros con gastritis crónica activa y no en perros con histología gástrica normal (Diker *et al.*, 2002). Lee *et al.* (1992) observaron hiperplasia linfoide marcada en el cuerpo y en el fundus del estómago luego de la infección experimental con *H. felis*, sin embargo, Simpson *et al.* (2000) encontraron un grado similar de inflamación en perros infectados experimentalmente con *H. felis* y en perros controles no infectados. En el examen histológico se pueden encontrar linfocitos, células plasmáticas y agregados linfocíticos. La cantidad de neutrófilos, eosinófilos, linfocitos o agregados linfocíticos no varía entre las distintas regiones del estómago, pero sí se encuentra mayor cantidad de células plasmáticas en el antro que en el cuerpo. Las especies NHPH caninas tienen una mayor afinidad por las células parietales que *H. pylori* en el hombre (Weber *et al.*, 1958; Henry *et al.*, 1987; Geyer *et al.*, 1993; Hermanns *et al.*, 1995). Los neutrófilos no juegan un rol importante en la gastritis canina como en la gastritis por *H. pylori* en el hombre (Handt *et al.*, 1994), y no existe asociación entre el número de bacterias NHPH y la presencia de células inflamatorias (Happonen, 1996). A pesar de la presencia de gran cantidad de bacterias, en muchos perros, las lesiones de mucosa son leves. Es común encontrar histológicamente una gastritis leve, aunque los perros, en general, son clínicamente sanos (Weber *et al.*, 1958; Henry *et al.*, 1987; Geyer *et al.*, 1993). Varias investigaciones mostraron asociación entre especies NHPH y gastritis crónica (Lee *et al.*, 1992; Geyer *et al.*, 1993; Handt *et al.*, 1994; Hermanns *et al.*, 1995).

En un estudio hecho por Happonen *et al.* (1996), no se encontraron diferencias en la presentación de gastritis entre diferentes regiones. Todos los perros tuvieron gastritis crónica leve en el fundus, cuerpo y antro; en algunos perros se encontró gastritis activa leve junto con gastritis crónica, en una, en dos o en las tres regiones. No hubo asociación entre el número de organismos y la presencia de gastritis activa.

Hermanns *et al.* (1995) examinaron biopsias de 122 perros, la mayoría con síntomas gastrointestinales, con bacterias NHPH en el 82% de las muestras. Los cambios histopatológicos más notables fueron la degeneración glandular con acumulación de linfocitos y granulocitos neutrófilos, fibrosis y edema de la lámina propia de la mucosa, folículos linfoides e infiltrados linfoplasmocitarios. De las células del epitelio glandular, sólo las células parietales se encontraron anormales, con vacuolas, algunas de tamaño más grande. El moco de las células epiteliales superficiales fue claramente reducido en algunos casos.

Eaton *et al.* (1996) evaluaron biopsias gástricas de 54 perros, la mayoría de ellos tenían gastritis linfocítica leve a moderada, con linfocitos dispersos y algunas células plasmáticas en la mucosa

superficial. No encontraron correlación entre la presencia y cantidad de bacterias con el grado histológico de gastritis.

Yamasaki *et al.* (1998) investigaron mediante histología la presencia de bacterias NHPH en 21 perros sanos y en 56 perros con signos gastrointestinales, y encontraron NHPH sobre la superficie mucosa dentro o debajo del moco, en las fosas gástricas y dentro del lumen glandular en 86% de perros clínicamente normales, y en 61% de perros clínicamente anormales.

Neiger *et al.* (1999) encontraron en perros infectados, gastritis de leve a moderada. En la gastritis leve hubo infiltración difusa de algunas células plasmáticas y linfocitos, mientras que en la moderada hubo agregados linfocíticos focales.

Diker *et al.* (2002), estudiaron 122 biopsias de perros eutanasiados por diferentes enfermedades. En la histopatología observaron gastritis crónica leve, caracterizada por linfocitos, células plasmáticas y agregados de linfocitos en 67 perros, de los cuales 34 también tenían gastritis activa crónica leve, caracterizada además por neutrófilos. Las bacterias se encontraron en el moco adyacente al epitelio superficial, en la lámina glandular adyacente a las células parietales y en las fosas gástricas. De 103 perros positivos a la presencia de especies NHPH, 56.3% tuvieron gastritis, y de 19 perros negativos, 47.4% también tuvieron hallazgos histológicos compatibles con gastritis. Se observaron bacterias NHPH en 86.6% de perros con gastritis y en 81.8% de perros sin lesiones gástricas.

Wiinberg *et al.* (2005) evaluaron 22 perros de Dinamarca con signos gastrointestinales y 8 perros eutanasiados por otras causas y observaron las bacterias NHPH en la parte superficial del moco gástrico o en la luz de las glándulas gástricas, pero también dentro de las células parietales en el 50% de los perros.

Robic *et al.* (2007) estudiaron 20 animales infectados pero sin signos clínicos y en todas las muestras encontraron gran número de bacterias, especialmente en la superficie de la mucosa, así como en la luz de las glándulas gástricas y en las partes más profundas de la mucosa, incluso en la submucosa en algunos casos. Los cambios histopatológicos hallados fueron compatibles con gastritis crónica; en todas las muestras se observaron los folículos linfoides característicos de la infección por especies NHPH y en algunos animales los cambios inflamatorios fueron acompañados de erosiones, úlceras pequeñas y gastritis crónica atrófica.

De Toledo Vieira *et al.* (2012) investigaron la presencia de especies NHPH en la mucosa gástrica de 60 perros mediante examen histopatológico y encontraron infiltrado inflamatorio predominantemente mononuclear (100%), hiperplasia de nódulos linfáticos (98,3%),

erosiones/ulceraciones (6,7%), hemorragia (5%) e hiperemia (95%). Ellos encontraron correlación entre el número de bacterias y número de células inflamatorias y nódulos linfoides, sugiriendo que las bacterias encontradas en la mucosa gástrica de los perros podrían ser responsables de las alteraciones que caracterizan a la gastritis.

Amorim *et al.* (2015) estudiaron 69 perros infectados, sólo en 3 los hallazgos histológicos fueron normales, en el resto (95,7%) hubo cambios histopatológicos representativos de gastritis crónica, de leve a moderada, con infiltración de linfocitos intraepiteliales en el 88,4%, y atrofia de la mucosa gástrica, anidación glandular o fibrosis en el 44,9% de las muestras. En un número escaso de perros se encontró infiltración neutrofílica anormal e infiltración leve de mastocitos.

En el estudio de la histopatología se ha informado la cantidad de bacterias presentes en las biopsias, aplicando distintos criterios de cuantificación. En relación a esto, Handt *et al.* (1994) y Happonen (1998) utilizaron la siguiente escala: ausencia: no se observan organismos, escasa cantidad: <10 organismos por sección, moderada cantidad: 10 a 50 organismos por sección y abundante cantidad: >50 organismos por sección. Okubo *et al.* (2017) estimaron la cantidad de bacterias utilizando una escala de ponderación con la cual evaluaron aleatoriamente tres campos de cada portaobjetos, atribuyendo una puntuación de 1 a 5 según el número promedio de bacterias y estableciendo los siguientes intervalos: 1-60 bacterias (puntuación 1); 61-120 (puntuación 2); 121-180 (puntuación 3); 181-240 (puntuación 4), por encima de 241 (puntuación 5). Los resultados se expresaron como mediana de las puntuaciones en cada grupo. Paz Zúñiga (2002) y Thibaut *et al.* (2007) determinaron el grado de infección clasificándolo en cuatro grados, ausencia, leve, moderado o marcado, según una escala análoga visual modificada para muestras de biopsias gástricas caninas. Jara Verdugo (2003) determinó la presencia de estas bacterias en estómago, intestinos, hígado y vesícula biliar y las cuantificó subjetivamente utilizando la siguiente escala: (+) escasas, (++) moderadas, (+++) abundantes y (-) ausente, aunque sin especificar la cantidad de bacterias en cada caso.

Si bien varios investigadores informaron la existencia de una correlación entre la infección con especies NHPH y patología gástrica y (Henry *et al.*, 1987; Lee, 1989; Lee *et al.*, 1992; Lecoindre *et al.*, 1995), Eaton *et al.* (1996) no pudieron establecer una relación significativa entre ambas, y Hermanns *et al.* (1995) y Yamasaki *et al.* (1998) informaron la ausencia de tal correlación.

La coinfección de varias especies ha sido reportada por varios investigadores (Weber *et al.*, 1958; Jalava *et al.*, 1998; Neiger *et al.*, 1999), aunque O'Connor y Lee, (1991) refirieron la interferencia entre especies y la exclusión competitiva entre ellas.

No está clara aún la importancia patogénica ni el significado clínico que tienen las bacterias NHPH en el perro, pero su patogenicidad es supuesta por las lesiones degenerativas observadas en las células parietales infectadas (Weber *et al.*, 1958; Henry *et al.*, 1987; Geyer *et al.*, 1993; Hermanns *et al.*, 1995). Tampoco se sabe acerca de las diferencias en la patogenicidad entre las distintas cepas dentro de una misma especie de NHPH.

#### **1.1.2.8- Signos clínicos:**

Si bien la infección con bacterias NHPH en humanos se asocia con síntomas gastrointestinales como dolor epigástrico y náuseas, hematemesis, dispepsia, consistencia y frecuencia de defecación irregular, vómitos, disfagia y disminución del apetito (Heilmann y Borchard, 1991; Wegmann *et al.*, 1991; Oliva *et al.*, 1993; Goddard *et al.*, 1997; Dieterich *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998; Mention *et al.*, 1999; Schildt *et al.*, 2000; Kaklikkaya *et al.*, 2002; Yoshimura *et al.*, 2002; Seo *et al.*, 2003; Sykora *et al.*, 2003; van Loon *et al.*, 2003), y con patologías gástricas como úlceras, adenocarcinoma y linfoma (Yang *et al.*, 1995 b; Debongnie *et al.*, 1998; Regimbeau *et al.*, 1998), también puede haber individuos asintomáticos (Mazzucchelli *et al.*, 1993).

En el perro pueden presentarse signos digestivos, aunque pareciera no existir una relación directa entre la presencia de la bacteria en el estómago y enfermedad gástrica, ya que algunos perros infectados presentan signos clínicos evidentes y otros no. Si bien 61 a 100% de perros infectados han tenido vómitos crónicos, en un 67 a 86% de perros también infectados, no se han evidenciado signos clínicos (Geyer, 1993; Hermanns, 1995; Lecoindre, 1995, Diker *et al.*, 2002; Hwang *et al.*, 2002; Gómez y Orozco, 2003).

#### **1.1.2.9- Diagnóstico:**

Tanto en humanos como en perros la técnica más utilizada para el diagnóstico de la infección por especies NHPH es la histopatología de las biopsias gástricas. La observación al microscopio óptico, por lo general, permite diferenciar entre las infecciones por bacterias NHPH o por *H. pylori* en humanos, ya que son fácilmente identificables por su morfología típica. Las especies NHPH son más largas que *H. pylori* con 6 a 8 espirales, no se adhieren a las células epiteliales y comúnmente se localizan en agregados en el lumen de las criptas. Sin embargo, a pesar de que tienen diferencias morfológicas, no se pueden identificar las diferentes especies de NHPH, ya que por ejemplo, los fibrilos periplásmicos característicos de *H. felis* pueden desaparecer y confundirse con otra especie parecida (Heilmann y Borchard, 1991). El examen histológico tiene una sensibilidad del 92.3% y una especificidad del 100% en perros (Happonen, 1998).

Las tinciones que se utilizan son H/E y Giemsa, sin embargo, tinciones especiales como tinciones de plata (Warthin- Starry) (Eaton *et al.*, 1996; Neiger *et al.*, 1998), Giemsa (Geyer *et al.*, 1993; Hermanns *et al.*, 1995), o azul de toluidina (Happonen *et al.*, 1996), son más sensibles y pueden aumentar las posibilidades de observación de las bacterias cuando hay baja densidad de colonización, ya que permiten detectar un menor número de bacterias al hacerlas fácilmente distinguibles, especialmente en las glándulas y en las células parietales, donde las bacterias aparecen como espirales negros sobre un fondo color amarronado (Simpson y Burrows, 1999).

La citología de la impronta de una muestra de biopsia gástrica (Debongnie *et al.*, 1995) y la del cepillado (Happonen *et al.*, 1996) teñida con Gram o tinción de Diff Quik, es excelente para la detección de estas bacterias por microscopía óptica (Neiger *et al.*, 1998), y ha demostrado ser más sensible que la observación histológica de la biopsia (Debongnie *et al.*, 1994; Debongnie *et al.*, 1995).

La prueba rápida de la ureasa también se utiliza para el diagnóstico, aunque puede no ser lo suficientemente sensible, debido a que la densidad de colonización de las especies NHPH es menor que la de *H. pylori* (Cutler, 1996).

El cultivo bacteriológico de las especies de *Helicobacter* es difícil y no siempre exitoso y, además, en el cultivo estas bacterias pueden perder su morfología típica, por lo cual no permite la determinación de las especies. Por otra parte, la mayoría de los organismos gástricos no son cultivables (Jalava *et al.*, 1998).

Actualmente no hay anticuerpos específicos disponibles para la detección serológica e inmunohistoquímica de especies NHPH; los anticuerpos policlonales anti-*H. pylori* disponibles comercialmente muestran reactividad cruzada entre *H. pylori* y NHPH (Singhal y Sepulveda, 2005). Aunque existe una prueba serológica en seres humanos para la detección de la infección por *H. pylori*, no existe una prueba similar válida para perros, ya que la presencia de múltiples especies de *Helicobacter* y la coinfección con varias de ellas, complican la evaluación serológica. Hong *et al.* (2015) analizaron muestras gástricas de perros mediante PCRs y encontraron *H. heilmannii* en el 37,5% de los perros y *H. felis* en el 25%, pero con los kits de antígenos para detectar *H. pylori* no lograron demostrar la presencia de especies NHPH en estas muestras.

La prueba de urea respiratoria también permite la detección de especies NHPH en perros (Cornetta *et al.*, 1998; Neiger *et al.*, 1998; Kubota *et al.*, 2013).

La microscopía electrónica (MET) ha sido utilizada para identificar las distintas especies de *Helicobacter* sobre la base de su morfología típica (Lockard y Boler, 1970; Henry *et al.*, 1987;

Geyer *et al.*, 1993), pero la ultraestructura celular de cepas cultivadas de *H. bizzozeronii* y *H. salomonis* no muestra una variación significativa entre ambas especies. Sólomente las cepas de *H. felis* atípicas, sin fibrilos periplásmicos, difieren de otras cepas de esta especie, pero son, a su vez, muy parecidas a *H. bizzozeronii*, por lo que no resulta un buen método para la diferenciación de especies.

El perfil de proteínas con el sistema de minigel (SDS PAGE) permite diferenciar *H. felis* y *H. bizzozeronii*. La diferenciación entre *H. salomonis* y *H. bizzozeronii* resulta más difícil con este método (Jalava *et al.*, 1997).

La PCR es la técnica más precisa para determinar con certeza el género y para identificar las especies (Hong *et al.*, 2015; Qin *et al.*, 2016). En un trabajo realizado por Moyaert *et al.* (2008), se estudiaron seis PCRs género *Helicobacter* específicas, basadas en el gen 16S ARNr. Los resultados de este estudio demostraron que la PCR descrita por Al-Soud *et al.* (2003) es altamente confiable para la identificación de especies de *Helicobacter* a nivel de género; esta resultó ser 100% inclusiva y 95,5% exclusiva, y puede detectar 10 células bacterianas por mezcla de reacción.

Para la mayoría de las especies de *Helicobacter*, <2% de divergencia o >98% de similitud en la secuencia del gen 16S ARNr, define de forma confiable una especie (Dewhirst *et al.*, 2005). Sin embargo, existe una similitud excepcionalmente alta (98-100%) en la secuencia del gen 16S ARNr entre *H. felis*, *H. bizzozeronii*, *H. salomonis*, *H. heilmannii*, *H. cynogastricus* y *H. baculiformis* (Jalava *et al.*, 1997; O'Rourke *et al.*, 2004; Van den Bulck *et al.*, 2006; Baele *et al.*, 2008 b). La PCR, seguida de la secuenciación, es la mejor forma de identificar a estas especies; a través de la secuenciación de los genes que codifican para el 16S o 23S ARNr, se puede diferenciar *H. suis* de los demás NHPH, ya que la secuencia del gen 16S ARNr de *H. suis* comparte sólomente 96 a 97% de su secuencia con aquellas de *H. felis*, *H. bizzozeronii*, y *H. salomonis*, pero no se puede diferenciar entre ellos, dado la alta similitud dentro de este gen (Dewhirst *et al.*, 2005; Van den Bulck *et al.*, 2006; Baele *et al.*, 2008; Haesebrouck *et al.*, 2009). Para diferenciar entre ellas, se puede realizar la amplificación de los genes *hsp60*, que codifican para la proteína de choque térmico (Mikkonen *et al.*, 2004), de los genes *ureAB*, que codifican las subunidades A y B de la ureasa (Neiger *et al.*, 1998; O'Rourke *et al.*, 2004), y del gen *gyrB* (Hannula y Hänninen, 2007), que tienen una menor similitud de secuencia que la del gen 16S ARNr.

Cuando se utilizan cebadores específicos del género *Helicobacter* que permiten la detección, pero no la diferenciación de las especies presentes en muestras clínicas, la secuenciación de los amplicones obtenidos puede dar más información acerca de las especies involucradas, sin embargo, en los casos de infecciones mixtas con diferentes especies de *Helicobacter* (Van den

Bulck *et al.*, 2006), se obtienen amplicones que difieren en secuencia. En ese caso, para identificar todas las especies presentes, es necesario realizar la clonación de los amplicones en un vector y la secuenciación de los clones; otra alternativa es utilizar cebadores específicos de cada especie, basado en el gen *16S ARNr* para distinguir *H. suis* de otras especies de *Helicobacter* (De Groote *et al.*, 1999), en los genes *ureAB*, para *H. felis*, *H. bizzozeronii* (Baele *et al.*, 2004; O'Rourke *et al.*, 2004) y *H. heilmanni* s.s. (Neiger *et al.*, 1998; Hwang *et al.*, 2002; Priestnall *et al.*, 2004), en el gen *hsp60*, para *H. salomonis* (Mikkonen *et al.*, 2004), o en el gen *gyrB*, para *H. bizzozeronii* (Hannula y Hänninen, 2007).

Se ha desarrollado una PCR específica para detectar *H. bizzozeronii*, *H. salomonis* y *H. felis* (BSF-PCR) con los cebadores *CAR577f* y *CAR636r* que son complementarios a los genes *16S ARNr* de estas especies y que amplifican un fragmento de este gen de 78-bp (Baele *et al.*, 2004). *H. felis*, *H. bizzozeronii* y *H. salomonis* están altamente relacionadas filogenéticamente y debido a que es difícil aislarlas *in vitro*, no se pueden identificar por los métodos tradicionales, por lo cual se ha desarrollado una PCR múltiple basada en los espacios intergénicos del ARNt y sobre el gen de la ureasa que, combinado con electroforesis capilar, permite la discriminación de estas tres especies.

Las cepas de *H. felis* difieren hasta en un 2%, y podrían confundirse con *H. bizzozeronii* y *H. salomonis* estrechamente relacionados (Dewhirst *et al.*, 2005). Por lo tanto, el análisis del gen *16S ARNr* es una herramienta apropiada para la discriminación de estas especies (Jalava *et al.*, 1997; De Groote *et al.*, 2001; Dewhirst *et al.*, 2005), pero se recomienda apoyar la definición taxonómica mediante el análisis de otros genes.

La hibridación ADN-ADN y perfil proteico de pared celular se han convertido en los estándares de oro para la identificación de las especies de *Helicobacter*. Sin embargo, la aplicación de estas técnicas se ve dificultada por la necesidad de cultivos puros, y además, no son adecuadas para la identificación de especies de *Helicobacter in situ* o de especies no cultivables (Vandamme *et al.*, 2000).

La secuenciación del genoma entero es la herramienta más fiable para la distinción de especies de *Helicobacter* estrechamente relacionadas (Joosten *et al.*, 2015).

#### **1.1.2.10- Tratamiento:**

El tratamiento para erradicar las bacterias NHPH está indicado en pacientes sintomáticos. Si bien no existen estudios aleatorizados que evalúen un tratamiento específico adecuado para la infección por especies NHPH en humanos, se aplica el mismo tratamiento utilizado para erradicar la infección por *H. pylori*. Se utiliza una terapia triple, combinando un inhibidor de la bomba de

protones (IBP) y claritromicina con amoxicilina o con metronidazol durante 2 semanas (Goddard *et al.*, 1997), o terapia cuádruple, combinando IBP, bismuto y dos antibióticos (incluyendo amoxicilina y bien claritromicina, metronidazol, levofloxacino, rifabutina o furazolidona). Luego de la erradicación de las especies NHPH suelen remitir tanto los síntomas clínicos como las alteraciones histológicas y las lesiones asociadas con la infección (Goddard *et al.*, 1997), incluido el linfoma MALT gástrico (Morgner *et al.*, 2000).

Los protocolos de tratamiento en animales de compañía se han basado en los que han resultado efectivos contra *H. pylori* en humanos (Strauss-Ayali y Simpson, 1999). *H. bizzozeronii*, *H. felis* y *H. salomonis* obtenidos de perros y gatos, mostraron ser sensibles, *in vitro*, a la ampicilina, claritromicina y tetraciclina, aunque también se encontró resistencia al metronidazol de algunas cepas de *H. bizzozeronii* y *H. felis* (Van den Bulck *et al.*, 2005 b). En perros, la terapia triple con claritromicina, amoxicilina y omeprazol o lansoprazol durante 21 días resulta eficiente para la erradicación de las bacterias NHPH (Mirzaeian *et al.*, 2013), aunque la infección recurre en los perros mantenidos en contacto con otros perros portadores de la bacteria (Anacleto *et al.*, 2011). En un estudio realizado con amoxicilina, metronidazol y subcitrate de bismuto en perros positivos a especies NHPH y con signos clínicos de gastropatía, se obtuvo mejoría del estado clínico en el 80% de los casos, pero, en este estudio, el 57% de los perros tratados mostró la presencia de especies NHPH en la mucosa gástrica a los tres años del tratamiento (Happonen *et al.*, 2008). Por otra parte, Leib *et al.* (2007) no encontraron ventajas de adicionar medicación para suprimir la secreción de ácido gástrico al tratamiento con antibióticos.

DeNovo y Magne (1995) usando una combinación de metronidazol, amoxicilina y famotidina lograron resolver los signos clínicos en el 90% de 63 perros y gatos infectados; Mirzaeian *et al.* (2013) también utilizaron omeprazol como inhibidor de la bomba de protones, claritromicina y amoxicilina pero durante 21 días, con buenos resultados.

Estudios recientes demostraron que la administración de una vacuna basada en la subunidad ureasa de *H. pylori* produjo una reducción en la colonización de *H. felis* en ratones (Moyat *et al.*, 2015). Por otra parte, las NHPH gástricas a través de la gamma-glutamyl transpeptidasa (GGT) convierten la glutamina (Gln) y el glutatión (GSH) en glutamato, produciendo el agotamiento de estos compuestos que pueden conducir al desarrollo de patologías gástricas. De Bruyne *et al.* (2016) mostraron que la suplementación oral de Gln y de GSH en ratones infectados con *H. suis*, reducían la gastritis y la proliferación de células epiteliales, por lo cual se presume que la administración oral de Gln y GSH podría servir para la terapéutica de estas infecciones.

## 1.2.- ZONOSIS

Debido a que las bacterias NHPH son comunes en los animales (cerdos, perros y gatos), se ha sugerido que la infección en los seres humanos podría ser una zoonosis. En una encuesta realizada por Stolte *et al.* (1994) en Alemania, resultó que de 125 pacientes con infección con *H. heilmannii* s.l., el 70,3% tenía contacto con uno o más animales. Otro estudio realizado sobre encuestas en ese mismo país, reveló una prevalencia de infección gástrica por *H. heilmannii* significativamente alta en personas que habían tenido contacto estrecho con animales domésticos como perros, gatos y cerdos (Meining *et al.*, 1998).

*H. suis* es la especie de NHPH más frecuente en seres humanos (Van den Bulck *et al.*, 2005 a), por lo que se presume que los cerdos podrían ser una fuente de infección para ellos. Se ha reportado que las infecciones humanas por *H. suis* varían de 13,9% (De Groote *et al.*, 2005) a 36,6% (Van den Bulck *et al.*, 2005 a), según estudios realizados en Bélgica. Goji *et al.* (2015) reportaron en Japón, la infección gástrica de una mujer por *H. suis*.

Hay estudios epidemiológicos que sugieren la transmisión de especies NHPH de perros a humanos; los perros podrían ser fuente de infección de *H. felis*, *H. heilmannii* y *H. bizzozeronii* (Solnick *et al.*, 1993; Thomson *et al.*, 1994; Jalava *et al.*, 2001; De Bock *et al.*, 2007). Thomson *et al.* (1994) observaron en una niña bacterias NHPH similares en morfología a las que se encontraron en el estómago de su perro. De Bock *et al.* (2007) en Bélgica comunicaron la presencia de *H. felis* en el estómago de una mujer con úlcera péptica y de *H. felis*, *H. bizzozeronii* y *Candidatus H. heilmannii* en el estómago de su perro.

*H. heilmannii* s.l. se encontró en un paciente humano suizo con úlceras y en uno de sus dos gatos. En ambos, la secuencia de un fragmento de 580 pb del gen *ureB* de *H. heilmannii*, resultó 100% idéntica. El otro gato tenía una cepa de *H. heilmannii* s.l. con la misma secuencia de un fragmento del gen *ureB* de 580 pb de otra cepa humana encontrada en GenBank (Dieterich *et al.*, 1998). Lavelle *et al.* (1994) reportaron la presencia de bacterias en un paciente humano con gastritis, que por microscopía electrónica, resultaron morfológicamente iguales que las que presentaban los gatos de su investigación. Ohtani *et al.* (2008) en Japón, también comunicaron enfermedad gástrica en un paciente que convivía con perros y con un gato, en el cual se encontraron bacterias espiraladas largas en la histopatología de su mucosa gástrica. Van Loon, *et al.* (2003) en los Países Bajos, comunicaron el caso de un niño de 5 años con gastritis, y mediante análisis de secuencia, determinaron que la cepa de *H. heilmannii* que tenía el niño, era la misma que tenían sus gatos. El hallazgo de *H. pylori* en gatos de un criadero comercial de Estados Unidos y, posteriormente, su aislamiento de heces, saliva y placa dental de gatos infectados (Fox *et al.*, 1995), sugirió que los gatos podrían ser los transmisores de este agente zoonótico al humano

(Handt *et al.*, 1994). Sin embargo, *H. pylori* no ha sido aislado de gatos callejeros ni domésticos, por lo que no se puede aseverar que *H. pylori* pueda ser transmitido de gatos a humanos. El hecho de haber encontrado la bacteria en gatos manipulados por personal y no en gatos callejeros o domésticos, sugiere que estos animales la adquirieron de los seres humanos, es decir que el aislamiento de *H. pylori* en gatos haya sido probablemente un caso de antropozoonosis (El-Zaatari *et al.*, 1997).

Si bien existen estudios en distintas zonas geográficas del mundo acerca de las especies de NHPH, tanto en humanos como en perros, y algunos reportes aislados de casos humanos infectados con NHPH que motivó la búsqueda de estas especies en sus perros, no hay investigaciones que relacionen la presencia de estas especies en un número significativo de humanos y en sus perros. En nuestro país, sólo hay antecedentes bibliográficos acerca del estudio de las especies NHPH en perros (Guendulain *et al.*, 2016), pero no en humanos.

## **OBJETIVOS:**

### **Objetivo general:**

Determinar si las personas con signos de gastritis crónica que tienen *Helicobacter* spp. y que poseen perros como mascotas, comparten las mismas especies con ellos.

### **Objetivos específicos:**

Identificar las especies de *Helicobacter* presentes en la mucosa gástrica de personas con gastritis crónica.

Identificar las especies de *Helicobacter* presentes en la mucosa gástrica de sus perros.

Determinar la prevalencia de las diferentes especies de *Helicobacter* en humanos y perros.

Determinar la importancia del uso de técnicas moleculares en la caracterización de especies de *Helicobacter*.

Determinar si existen diferencias histopatológicas en la mucosa gástrica de perros según la especie de *Helicobacter* encontrada.

Evaluar si la presencia de bacterias del género *Helicobacter* en perros varía según raza, sexo, edad y estilo de vida.

## CAPÍTULO II

# MATERIALES Y MÉTODOS

## MATERIALES Y MÉTODOS

Previamente a la realización del trabajo de tesis específico, se planteó la ejecución de una etapa preliminar (primera etapa) para conocer el estado de situación de la bacteria en estudio en nuestro ámbito, y para realizar el entrenamiento en la técnica de gastroscopía, toma de muestras, lectura e identificación de *Helicobacter* spp.

### PRIMERA ETAPA

#### Selección de perros:

En esta primera etapa se trabajó con 26 perros, entre 2 meses y 12 años de edad, 2 de razas puras y el resto mestizos, 15 machos y 11 hembras, 6 con signos clínicos de enfermedad gastrointestinal y 20 normales. Los perros estaban alojados en los caniles de la Facultad de Agronomía y Veterinaria (FAV) de la Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC) por diferentes motivos (en tratamiento o en espera de adopción), otros eran propiedad de alumnos de la carrera de Medicina Veterinaria, y otros eran pacientes del Hospital de Clínica Animal de la FAV derivados a cirugía, a los cuales se les investigó la presencia de *Helicobacter* spp. en el momento de la anestesia, previo consentimiento de sus dueños. Los perros se incluyeron en el estudio independientemente de la presencia o ausencia de signos digestivos.

#### Reparo ético:

Los propietarios de los perros que intervinieron en este trabajo de investigación prestaron su consentimiento informado para la participación de sus mascotas en el mismo (Anexo 1).

#### Toma de muestras:

A todos los perros se les tomaron muestras de la mucosa gástrica mediante endoscopia en las instalaciones del Hospital. Para el estudio endoscópico, previo ayuno de 24 horas, se les realizó anestesia general con el siguiente protocolo: nalbufina (1mg/kg) + acepromacina (0,05 mg/kg) IM como premedicación, propofol (5 mg/kg) IV a efecto para la inducción e intubación, e isoflurano para el mantenimiento. Se utilizó un videoendoscopio flexible marca Storz (Alemania), modelo 60914NKS, con un tubo de inserción de 1,4 m de largo, 9,8 mm de diámetro y canal de biopsia de 2,8 mm. Cada perro se colocó en decúbito lateral izquierdo y el equipo se introdujo por la boca hasta llegar al estómago, donde se realizó la inspección visual de la mucosa gástrica de las zonas del cardias, fundus, cuerpo y antro pilórico. Mediante el pasaje de la pinza de biopsia por el canal de trabajo del endoscopio, se tomaron tres muestras de mucosa gástrica, con una se realizó una impronta en portaobjeto, otra se colocó en un envase con formalina al 10% para histopatología, y la

tercera se colocó en un tubo tipo eppendorf estéril que se conservó en ultracongelador (Thermo Quest, Forma Scientific 8458, EUA) a -70 °C para la posterior realización de la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa). El endoscopio y la pinza de biopsia fueron lavados con detergente enzimático Cidezyme® Johnson&Johnson Medical Ltd Gargrave UK y desinfectados con un desinfectante de alto nivel en base a una solución acuosa de ortoformaldehído al 0,55% (Cidex® OPA) entre las tomas de muestras de cada paciente, según recomendaciones de la Organización Mundial de Endoscopia (WGOWEO, 2011).

#### **Identificación de las muestras:**

Las muestras fueron identificadas y los datos de los perros y de sus propietarios fueron asentados en fichas individuales (Anexo 4).

## **SEGUNDA ETAPA**

En una segunda etapa se desarrolló el trabajo específico del proyecto. Se realizó un estudio cualitativo, con un diseño emergente, en el cual la muestra se fue construyendo en el proceso de trabajo de campo. El estudio se realizó en el transcurso de dos años. La incorporación de los individuos a la muestra fue de todos los que manifestaron querer participar voluntariamente y que cumplieran con los siguientes criterios: pacientes humanos con signos clínicos de gastritis crónica, los cuales tenían perros como mascotas y resultado positivo a formas compatibles con *Helicobacter* spp. en la histopatología de sus biopsias gástricas.

#### **Selección de pacientes humanos:**

Se trabajó con pacientes humanos que por presentar signos de gastritis crónica eran derivados por indicación médica al servicio de endoscopia del Nuevo Hospital San Antonio de Padua de la ciudad de Río Cuarto. Previo a la realización del estudio endoscópico se los contactó telefónicamente para consultarles si tenían perros como mascotas y si accederían, en caso que resultaran positivos a la presencia de *Helicobacter* spp., a que se le realizara el mismo estudio a su perro para la búsqueda de la bacteria. De un total de 145 pacientes, se seleccionaron 30 que cumplían con los criterios de inclusión para este estudio. Los datos de estas personas se asentaron en una ficha confeccionada para tal fin (Anexo 5).

#### **Reparo ético:**

Los pacientes seleccionados prestaron su conformidad por escrito para el estudio de las muestras gástricas obtenidas por los profesionales médicos del Hospital y para la participación de sus mascotas en esta investigación (Anexos 2 y 3). Se siguieron las pautas éticas internacionales para

la investigación biomédica, propuestas por el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS) en colaboración con la Organización Mundial de la Salud, así como las pautas CIOMS epidemiológicas. Esta investigación fue aprobada por el Comité de ética CIEIS UNRC.

#### **Toma de muestras:**

Los profesionales médicos del Hospital les tomaron muestras gástricas mediante endoscopia a las personas seleccionadas. El paciente se colocó en decúbito lateral izquierdo, se le topicó la zona faríngea con spray de lidocaína y se introdujo por vía oral el endoscopio. Se utilizó un gastrofibroscopio Olympus, con un tubo de inserción de 1,10 m y 9 mm de diámetro y se le tomaron muestras de la mucosa gástrica (fundus del estómago y zona del antro pilórico) mediante el pasaje de la pinza de biopsia a través del canal del fibroscopio. Las muestras de fundus y antro pilórico se colocaron en un envase con formol tamponado al 10% para histopatología y otras en un tubo tipo eppendorf que se conservó en ultracongelador (Thermo Quest, Forma Scientific 8458, EUA) a -70 °C hasta la realización de la PCR. La endoscopia, la toma de muestras y el procesamiento de las mismas para histopatología y su posterior lectura fueron realizados por los profesionales del Nuevo Hospital de Río Cuarto.

#### **Identificación de las muestras:**

Las muestras fueron identificadas con el nombre del paciente, el número de historia clínica y la fecha de la toma de muestra, sólo a los fines de poder reconocer su procedencia a la hora del procesamiento, aunque estos datos se mantuvieron en estricta reserva.

#### **Perros de los pacientes humanos:**

A los perros (n=30) de los pacientes humanos con resultado positivo a formas compatibles con *Helicobacter* spp. en la histopatología de sus biopsias gástricas, también se les realizó endoscopia gástrica en las instalaciones del Hospital de Clínica Animal de la Universidad Nacional de Río Cuarto, independientemente de su condición clínica (25 sin signos gastrointestinales y 5 con signos). Para ello, previo ayuno de 24 horas, se les realizó anestesia general con el siguiente protocolo: nalbufina (1mg/kg) + acepromacina (0,05 mg/kg) IM como premedicación, propofol (5 mg/kg) IV a efecto para la inducción e intubación e isoflurano 1,7 vol % para el mantenimiento.

#### **Toma de muestras:**

Para la gastroscopia el perro se colocó en decúbito lateral izquierdo. Se utilizó un videoendoscopio flexible marca Storz (Alemania), modelo 60914NKS, con un tubo de inserción de

1,4 m de largo, 9,8 mm de diámetro y canal de biopsia de 2,8 mm. El equipo se introdujo por la boca hasta llegar al estómago y mediante el pasaje de una pinza de biopsia por el canal de trabajo del endoscopio, se tomaron muestras de mucosa gástrica del fundus, cuerpo y antro pilórico para la realización de impronta, histopatología y PCR de cada una de estas zonas.

Las improntas se realizaron sobre portaobjetos con las muestras recién obtenidas, otras muestras se colocaron en un envase con formol tamponado al 10% para histopatología, y otras se colocaron en un tubo tipo eppendorf estéril que se almacenó en ultracongelador (Thermo Quest, Forma Scientific 8458, EUA) a -70 °C hasta la realización de la PCR. El endoscopio y la pinza de biopsia fueron lavados con detergente enzimático Cidezyme® Johnson&Johnson Medical Ltd Gargrave UK y sometidos a una desinfección de alto nivel con una solución acuosa de ortoftalaldehído al 0,55% (Cidex® OPA) entre las tomas de muestras de cada paciente, según recomendaciones de la Organización Mundial de Endoscopía (WGO/WEO, 2011).

#### **Identificación de las muestras:**

Las muestras fueron identificadas y los datos de los perros y de sus propietarios fueron asentados en fichas individuales (Anexo 4).

#### **Procesamiento de las muestras (primera y segunda etapa):**

##### **Impronta:**

Las improntas se realizaron mediante un apoyo suave de la muestra de biopsia en varios puntos del portaobjetos, y se tiñeron con May Grunwald-Giemsa.

##### **Histopatología:**

Las muestras para histopatología de los pacientes humanos fueron procesadas, teñidas, observadas al microscopio óptico e informadas por los profesionales del Hospital. Las muestras se incluyeron en parafina, se cortaron con micrótopo Microm® HM 310, y se obtuvieron especímenes de 5 µm de espesor. Cada sección fue montada en un portaobjetos y coloreada con May Grunwald Giemsa. La observación de las muestras se realizó con un microscopio óptico Nikon® Eclipse E400 con procesador de imágenes, con aumento 1000X con aceite de inmersión en busca de estructuras con morfología y tamaño compatibles con *Helicobacter* spp.

Las muestras de perros se incluyeron en parafina, se cortaron con micrótopo Leica®, modelo Jung®2065 Supercut y se obtuvieron especímenes de 5 µm de espesor. Cada sección fue montada en un portaobjetos y coloreada con H/E. La observación de las muestras se realizó con un microscopio óptico Axiostar plus, Zeiss® con procesador de imágenes, con aumento 1000X con

aceite de inmersión en busca de estructuras con morfología y tamaño compatibles con *Helicobacter* spp.

Se realizó la observación de todo el tejido obtenido, debido al tamaño pequeño de la muestra que se obtiene mediante biopsia. Se utilizó la siguiente escala para informar la cantidad de organismos por muestra de tejido:

Ausencia: no se observan organismos

Escasa cantidad: <10 organismos por sección

Moderada cantidad: 10 a 50 organismos por sección

Abundante cantidad: > 50 organismos por sección (Handt *et al.*, 1994; Happonen, 1998).

La cantidad de organismos se evaluó en las muestras de todos los perros, pero el estudio histopatológico sólo se realizó sobre las muestras gástricas de los 30 perros de la segunda etapa. La descripción de los hallazgos histológicos se realizó según la guía establecida por la Asociación Mundial de Veterinarios de Animales Pequeños (WSAVA), quienes desarrollaron estándares endoscópicos y microscópicos en gastroenterología de animales pequeños (Day *et al.*, 2008).

En esta guía se definió como cantidad normal de linfocitos intraepiteliales una población escasa de aproximadamente 1-2 células en una distancia de 50 células epiteliales; un aumento leve de los linfocitos se definió como una población de hasta 10 linfocitos por tramo de 50 células epiteliales; un aumento moderado como una población de hasta 20 linfocitos en una distancia de 50 células epiteliales; y un aumento marcado cuando hay infiltración difusa del epitelio hasta con 50 linfocitos en una distancia de 50 células epiteliales.

En cuanto a los linfocitos y células plasmáticas en la lámina propia, se considera normal cuando, debajo del epitelio superficial y entre las glándula, se observan <20 células por campo 400X de linfocitos individuales dispersos y células plasmáticas; leve aumento cuando debajo del epitelio y entre las glándulas existen entre 20 y 50 células por campo 400X de linfocitos y células plasmáticas; aumento moderado cuando en la lámina propia y en las glándulas hay entre 50 y 100 células por campo 400X de agregados de linfocitos y células plasmáticas, y aumento marcado cuando hay más de 100 células por campo 400X y el infiltrado difuso de las células ocupa gran parte del área de la lámina propia, y en ocasiones infiltra e interrumpe la estructura glandular.

En cuanto a los eosinófilos en la lámina propia, en la mucosa normal se encuentran 1 o 2 eosinófilos por campo 400X; hay leve aumento cuando existen grupos de eosinófilos de hasta 20 células por campo 400x; aumento moderado cuando la infiltración de eosinófilos dentro de la lámina propia es más extensa (hasta 50 células por campo 400X); y aumento marcado cuando la

Infiltración de la lámina propia es difusa y en ocasiones de la estructura glandular (hasta 100 células por campo 400X).

Con respecto a los neutrófilos en la lámina propia, en la mucosa normal no deberían estar presentes. Hay leve aumento de los neutrófilos de la mucosa cuando están dispersos dentro de la lámina propia superficial (10-20 células por campo 400X); aumento moderado cuando hay Infiltración más extensa (hasta 50 células por campo 400X); y aumento marcado cuando hay infiltración difusa de la lámina propia y, a veces, de las glándulas (> a 100 células por campo 400X).

### **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):**

#### **Extracción de ADN**

Para la extracción del ADN, cada una de las muestras de biopsia gástrica, tanto de humanos como de perros, fue suspendida en 1 ml de solución fisiología estéril, agitada vigorosamente con vortex (MX-S, Dragonlab, China) por 1 min y centrifugada a 10.000 rpm por 10 min a 4 °C. El sobrenadante fue descartado y el ADN del sedimento fue extraído con kit comercial (DNAzol, Invitrogen, CA, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Cox, 1968):

- Se agregaron 0,5 ml de DNAzol
- Se mezcló con pipeta
- Se centrifugó a 10.200 rpm por 10 min a 4 °C
- Se transfirió el sobrenadante a un tubo estéril de 1,5 ml.
- Se agregaron 500 µl de etanol al 100%
- Se incubó por 2 h a -20 °C
- Se centrifugó a 13.950 rpm por 4 min a 4 °C
- Se descartó el sobrenadante
- Se agregaron 1000 µl de etanol al 75%
- Se invirtió el tubo 3 a 6 veces
- Se centrifugó a 13.950 rpm por 4 min a 4 °C
- Se descartó el sobrenadante
- Se agregaron 1000 µl de etanol al 75%
- Se centrifugó a 13.950 rpm por 4 min a 4 °C
- Se dejó el tubo invertido abierto sobre papel tissue
- Se agregaron 20 µl de OHNa 8 mM a 4 °C
- Se pipeteó hasta disolver el pellet
- Se guardó a 4 °C

El ADN obtenido fue almacenado a -20 °C (Freezer Whirlpool, WVU26C, Whirlpool S.A., Brasil) hasta el momento de su procesamiento (Cox, 1968).

### **Amplificación por PCR**

Controles positivos:

Los controles positivos para la realización de las PCRs fueron cedidos por investigadores de la Universidad de Ghent en Bélgica, referentes en el tema, quienes aportaron cepas de *H. bizzozeronii*, *H. felis*, *H. salomonis* y ADN de *H. heilmannii*, *H. cynogastricus* y *H. suis*. El ADN control de *H. pylori* fue cedido por la Dra. Cinthia Goldman de la Facultad de Bioquímica de la UBA.

Estandarización de la técnica:

Con el ADN obtenido de las muestras de los perros de la primera etapa se realizó la PCR tamiz (*Helicobacter* spp.) y una PCR que identifica *H. bizzozeronii*, *H. felis* y *H. salomonis*. Las muestras positivas a la PCR tamiz y negativas a *H. bizzozeronii*, a *H. felis* y a *H. salomonis* fueron nuevamente amplificadas (Al Soud *et al.*, 2003) y los productos de la PCR fueron purificados (Puriprep-GP Kit, InbioHighway, Tandil, República Argentina), cuantificados y secuenciados (ABI 3130xl; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Con el ADN obtenido de las muestras de los humanos y de los perros de la segunda etapa, se realizó primero, la PCR para determinar la presencia del género *Helicobacter* (*Helicobacter* spp.). Luego, tanto a las muestras positivas como a las negativas se les realizó una PCR para detectar *H. pylori*, una PCR múltiple para detectar *H. bizzozeronii*, *H. felis* y *H. salomonis*, y otra para *H. suis*. Finalmente a las muestras que resultaron negativas a estas PCRs específicas de especie se les realizó una PCR que detecta el gen *UreAB* y que permite identificar especies por secuenciación.

Las secuencias fueron visualizadas con el software BioEdit (Hall, 2007) y alineadas con las bases de datos disponibles utilizando el software BLAST (Altschul *et al.*, 1990).

Las amplificaciones se realizaron con un ciclador Labnet MultiGene™ Gradient PCR Thermal Cycler, Edison, EUA.

**Helicobacter spp.** (Al Soud *et al.*, 2003)

### **Mezcla para la PCR, cebadores y condiciones de amplificación:**

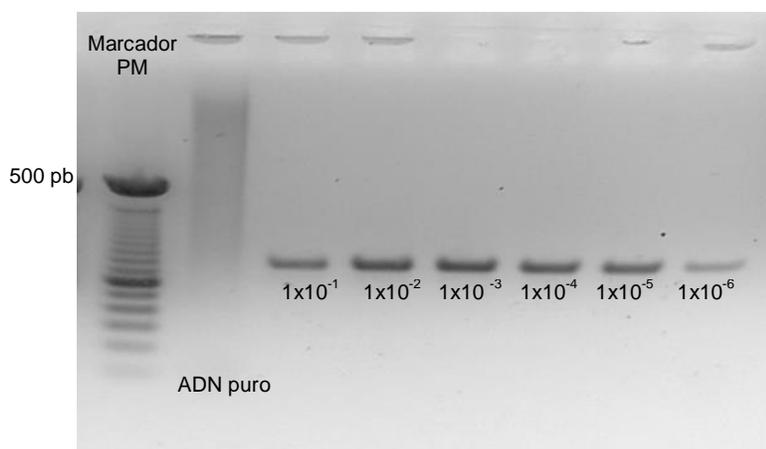
Para la detección de *Helicobacter* spp. se amplificó un fragmento de 780 pb del gen *16S ARNr* utilizando las condiciones descritas por Al-Soud *et al.* (2003). Se utilizaron cebadores género

específicos previamente publicados por Goto *et al.* (2000): 1F (5'-CTATGACGGGTATCCGGC-3') y 1R (5'- CTCACGACACGAGCTGAC-3').

El ADN extraído se amplificó en un volumen final de 30  $\mu$ l (25  $\mu$ l de mezcla de reacción y 5  $\mu$ l de ADN templado). La mezcla de reacción contenía 0,5  $\mu$ M de cada cebador, 0,2 mM de cada desoxinucleótido (dNTPs), 1x de buffer, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,25 U de ADN polimerasa (T-plus ADN polimerasa, Inbio Highway, Tandil, Argentina), y 5  $\mu$ l de ADN extraído.

Las condiciones de amplificación fueron: una desnaturalización inicial de 2 min a 94 °C; seguida de 35 ciclos de desnaturalización (modificado de Al Soud, 2003) de 30 seg a 94 °C, un annealing de 30 seg a 55 °C y una extensión de 30 seg a 72 °C; y finalmente, 5 min a 72 °C.

Se utilizó como control positivo ADN de *H. pylori*, y como control negativo una mezcla de reacción sin ADN. Para la estandarización de la técnica se utilizó ADN de *H. pylori* diluido en base 10 (Figura 1).



**Figura 1:** Corrida electroforética en gel de agarosa de ADN amplificado por PCR. A la izquierda se observa el marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen). En las calles restantes se observan los amplímeros de 780 pb obtenidos diluyendo en base 10 el ADN de *H. pylori*.

***H. pylori*** (Bickley *et al.*, 1993)

#### **Mezcla para la PCR, cebadores y condiciones de amplificación:**

La PCR se realizó en un volumen final de 30  $\mu$ l (25  $\mu$ l de mezcla de reacción y 5  $\mu$ l de ADN templado), con una concentración de 0,5  $\mu$ M de cada cebador, 0,2 mM de cada desoxinucleótido, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2,5 U de ADN polimerasa y 1x de buffer.

Se utilizaron los cebadores descritos por Brisou *et al.* (1990) específicos para dos secuencias flanqueando un fragmento interno de 294 pb del gen *C* de la ureasa de *H. pylori* (5'-AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT-3') y (5'-AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC-3').

Las condiciones de amplificación incluyeron una desnaturalización inicial del ADN a 99 °C 5 min, seguida de 35 ciclos de 1 min a 93 °C, 1 min a 55 °C, 1 min a 72 °C. El ciclo final incluyó una extensión de 8 min a 72 °C.

Se utilizó como control positivo ADN de *H. pylori*, y como control negativo una mezcla de reacción sin ADN.

***H. bizzozeronii*, *H. felis* y *H. salomonis*** (Baele *et al.*, 2004)

#### **Mezcla para la PCR, cebadores y condiciones de amplificación:**

Para la identificación de *H. bizzozeronii*, *H. felis* y *H. salomonis* se utilizaron las condiciones de amplificación de una PCR múltiple específica para estas especies (Baele *et al.*, 2004), con los cebadores CAR577f (5'-TGC GTAGGCGGGGTTGTAAG-3') y CAR636r (5'-CAGAGTTGTAGTTTCAAATGC-3'), que son complementarios a los genes *16S ARNr* de estas especies.

Para la detección de *H. bizzozeronii* se utilizaron los cebadores Bi1F (5'-AACCAAYAGCCCCAG CAGCC-3') y Bi2R (5'-TGGTTTTAAGGTTCCAGCGC-3'), y para la detección de *H. felis* se usaron los cebadores Fe1F (5'-TTTGGTGCTCACTAACGCCCTC-3') y Fe3R (5'-TTCAATCTGATCGCG TAAAG-3'). Las que dieron positivas con los cebadores CAR577f y CAR636r y negativas a *H. bizzozeronii* y *H. felis* se consideraron positivas a *H. salomonis*.

La PCR se realizó en un volumen final de 30 µl (25 µl de mezcla de reacción y 5 µl de ADN templado), con una concentración de 0,1 µM de cada cebador, 40 µM de cada desoxinucleótido, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,03 U de ADN polimerasa, y 1x de buffer.

Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 95°C 3 min, seguida de 35 ciclos de 30 seg a 94 °C, 30 seg a 60 °C, 45 seg a 72 °C, y 5 min a 72 °C.

Se utilizó como control positivo ADN de *H. bizzozeronii*, *H. felis* y *H. salomonis*, y como control negativo una mezcla de reacción sin ADN (Figura 2).



**Figura 2:** Corrida electroforética en gel de agarosa de ADN amplificado por PCR. El producto de 434 pb corresponde al control positivo de *H. felis* y el producto de 373 pb corresponde al control positivo de *H. bizzozeronii*.

### **Otras especies de *Helicobacter*** (Flahou *et al.*, 2014)

#### **Mezcla para la PCR, cebadores y condiciones de amplificación:**

A las muestras que resultaron positivas a *Helicobacter* spp., pero negativas a *H. bizzozeronii*, *H. felis* y *H. salomonis*, se les realizó una PCR para la amplificación de un fragmento de 250 pb de los genes A y B de la ureasa (*UreAB*) usando las condiciones descriptas por Flahou *et al.* (2014).

Se utilizaron los cebadores: NHPHkortF (5'-CDGTRMGNTTTGARCCNGG-3') y NHPHkortR (5'-GTDGTDGGDCCRTACATWGA-3').

El ADN extraído se amplificó en un volumen final de 40  $\mu$ l (35  $\mu$ l de mezcla de reacción y 5  $\mu$ l de ADN templado), con una concentración de 1  $\mu$ M de cada cebador, 0,2 mM de cada desoxinucleótido (dNTPs), 1x de buffer, 2,5  $\mu$ M MgCl<sub>2</sub> y 2,5 U de ADN polimerasa.

Las condiciones de amplificación fueron: una desnaturalización inicial de 3 min a 94 °C; seguida de 40 ciclos de desnaturalización de 45 seg a 94 °C, un annealing de 45 seg a 57 °C y una extensión de 45 seg a 72 °C; y finalmente, 5 min a 72 °C.

Se utilizó como control positivo ADN de *H. pylori*, *H. bizzozeronii* y *H. felis*, y como control negativo una mezcla de reacción sin ADN.

Los productos de amplificación del ADN fueron purificados (Puriprep-GP Kit, Inbio Highway, Argentina), cuantificados y secuenciados (ABI 3130xl; Applied Biosystems, Instituto de Biotecnología (INTA-Castelar) con los cebadores descriptos. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las disponibles en la base de datos GENBANK mediante BLAST

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

***H. suis*** (De Groote *et al.*, 1999)

#### **Mezcla para la PCR, cebadores y condiciones de amplificación:**

La PCR se realizó en un volumen final de 50 µl, con una concentración de 0,5 µM de cada cebador, 0,2 mM de cada desoxinucleótido, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1,5 U de ADN polimerasa, y 1x de buffer.

Se utilizaron los cebadores: V832f (5´-TTG GGA GGC TTT GTC TTT CCA-3´) y V1261r (5´-GAT TAG CTC TGC CTC GCG GCT-3´) específicos para amplificar un fragmento de 433 pb del gen *16S ARNr* de *H. suis*.

Las condiciones de amplificación incluyeron una preincubación de 9 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de 30 seg a 94 °C, 30 seg a 60 °C, y 45 seg a 72 °C, y una extensión final por 5 min a 72 °C.

Se utilizó como control positivo ADN de *H. suis*, y como control negativo una mezcla de reacción sin ADN.

En todos los casos el producto de la PCR fue corrido en un gel de agarosa al 1,5%, teñido con bromuro de etidio (5 ugrs/ml), en 1x de buffer TAE, a 70 V durante 30 min, y observado bajo luz UV.

#### **Análisis estadístico de los datos**

Se realizó un análisis exploratorio de datos, resumiendo la información en tablas para cada etapa. Se compararon las tres técnicas utilizadas para la detección de bacterias (impronta, histopatología y PCR) mediante el *Test de Simetría Q-Cochran* para variables cualitativas binarias y muestras apareadas con más de dos grupos. Luego se realizó un análisis a posteriori comparando las técnicas de a pares (impronta y PCR) mediante el *Test no paramétrico McNemar*. Para relacionar la presencia de bacterias en el perro y en el humano se realizó una *Regresión Logística* y se obtuvo el odds ratio (OR). Todos los análisis fueron realizados con el software R (Ihaka R y Gentleman R, 2018).

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS

## RESULTADOS

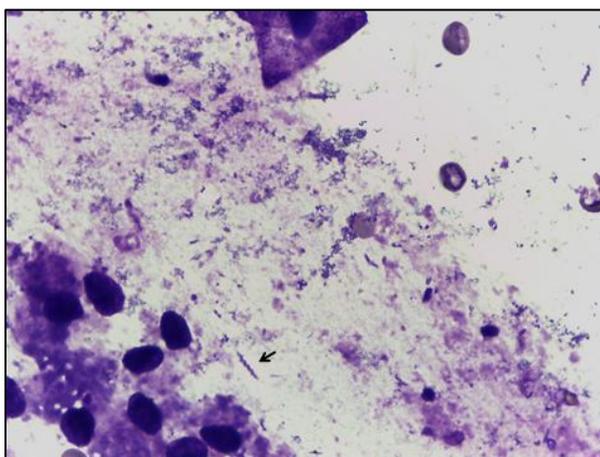
### PRIMERA ETAPA

#### IMPRONTA:

En 24 de 26 improntas (92,3%) se encontraron estructuras compatibles con *Helicobacter* spp., mientras que 2 de 26 (7,7%) fueron negativas (Tabla 1). En todas las improntas positivas la cantidad de bacterias presentes fue abundante (Figura 1).

**Tabla 1: Improntas de mucosa gástrica de perros**

	Presencia <i>Helicobacter</i> spp.	Ausencia <i>Helicobacter</i> spp.
N° de muestras	24/26 (92,3%)	2/26 (7,7%)



**Figura 1:** Impronta gástrica con estructuras de forma espiralada compatibles con *Helicobacter* spp. (flecha). Se observan también sobre un fondo de precipitado mucoso células de tipo epitelial sin atipias, escasos neutrófilos y glóbulos rojos (May Grünwald Giemsa, 1000X).

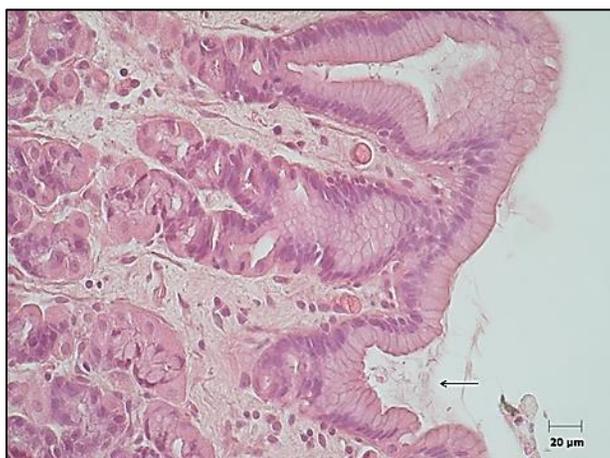
#### HISTOPATOLOGÍA:

Las 26 muestras (100%) fueron positivas a la presencia de estructuras morfológicamente compatibles con *Helicobacter* spp. (Figuras 2 y 3).

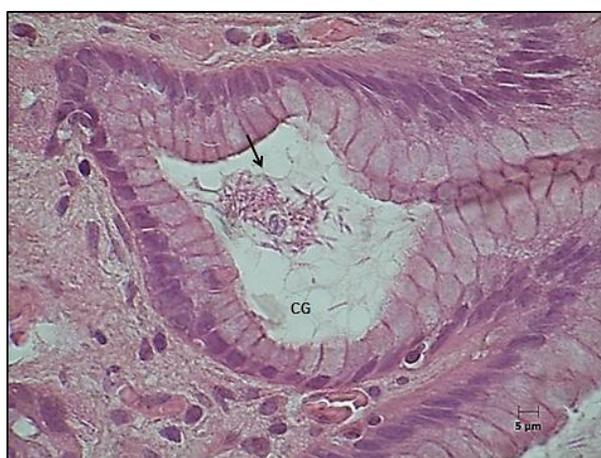
La cantidad de bacterias presentes por muestra de biopsia gástrica fue escasa (hasta 10) en el 27% de los perros, moderada (de 10 a 50) en el 38%, y abundante (más de 50) en el 35% (Tabla 2).

Tabla 2: Cantidad de bacterias en las histopatologías de las biopsias gástricas de perros

	Escasa (hasta 10)	Moderada (de 10 a 50)	Abundante (más de 50)
Nº de muestras	7/26 (27%)	10/26 (38%)	9/26 (35%)



**Figura 2:** Microfotografía de biopsia gástrica de perro, región fúndica. Se observan abundantes estructuras compatibles con *Helicobacter* spp. (flecha) (H/E, 400X).



**Figura 3:** Microfotografía de biopsia gástrica de perro, región fúndica. Se observan en la cripta gástrica (CG) abundantes estructuras compatibles con *Helicobacter* spp. (flecha) (H/E, 1000X).

A la observación endoscópica de la mucosa gástrica, 5 (71,4%) de los 7 perros que tenían escasa cantidad de bacterias en la biopsia gástrica, no presentaron alteraciones macroscópicas y 2 (28,6%) tenían alteraciones visibles. De los 10 perros que tenían moderada cantidad de bacterias en la biopsia gástrica, 5 (50%) no presentaron alteraciones en la mucosa y 5 (50%) sí. En cuanto a los 9 que tenían abundante cantidad de bacterias en la biopsia gástrica, 6 (66,7%) no presentaron alteraciones en la mucosa y 3 sí (33,3%) (Tabla 3 - Figuras 4 y 5).

**Tabla 3: Cantidad de bacterias en las histopatologías de las biopsias gástricas de perros y aspecto endoscópico de la mucosa**

Cantidad de bacterias en biopsia gástrica	Mucosa sin alteraciones endoscópicas	Mucosa con alteraciones endoscópicas
Escasa	5/7 (71,4%)	2/7 (28,6%)
Moderada	5/10 (50%)	5/10 (50%)
Abundante	6/9 (66,7%)	3/9 (33,3%)



**Figura 4:** Aspecto normal de la mucosa gástrica de perro en la región del antro pilórico visualizada mediante endoscopia.



**Figura 5:** Vista endoscópica de la región del cuerpo gástrico con abundante contenido.

**PCR:**

La técnica de PCR se realizó sobre 23 de las 26 muestras tomadas. De estas muestras 10 resultaron positivas a *Helicobacter* spp., 7 a *H. bizzozeronii*, 1 a *H. felis* y 2 negativas a *H. bizzozeronii* y a *H. felis*. Estas muestras positivas a la PCR tamiz y negativas a *H. bizzozeronii* y a *H. felis* fueron nuevamente amplificadas y los productos de la PCR fueron purificados, cuantificados y secuenciados, resultando una muestra positiva a *H. bizzozeronii* y otra a *H. felis* (Tabla 4).

**Tabla 4: Especies de *Helicobacter* encontradas en las biopsias gástricas de los perros de la primera etapa determinadas por PCR**

<i>Helicobacter</i> spp.	<i>H. pylori</i>	<i>H. bizzozeronii</i>	<i>H. felis</i>	<i>H. salomonis</i>	<i>H. heilmannii</i>	<i>H. cynogastricus</i>	<i>H. suis</i>
10/23 (43,5%)	0/23 (0%)	8/23 (34,8%)	2/23 (8,7%)	0/23 (0%)	0/23 (0%)	0/23 (0%)	0/23 (0%)

## SEGUNDA ETAPA

### HUMANOS

#### HISTOPATOLOGÍA:

Todas las biopsias gástricas (100%) fueron positivas a la presencia de estructuras morfológicamente compatibles con *Helicobacter* spp. (criterio de inclusión: personas positivas a formas compatibles con *Helicobacter* spp. en la histopatología de las biopsias gástricas).

#### PCR:

De 30 pacientes estudiados, hubo 24 positivos a *Helicobacter* spp., todos positivos a *H. pylori* y negativos a *H. bizzozeronii*, a *H. felis*, a *H. salomonis*, a *H. heilmannii*, a *H. cynogastricus* y a *H. suis*. Hubo una muestra que dio negativa a *Helicobacter* spp. y positiva a *H. pylori* (Tabla 5).

**Tabla 5: Especies de *Helicobacter* encontradas en las biopsias gástricas de humanos determinadas por PCR**

<i>Helicobacter</i> spp.	<i>H. pylori</i>	<i>H. bizzozeronii</i>	<i>H. felis</i>	<i>H. salomonis</i>	<i>H. heilmannii</i>	<i>H. cynogastricus</i>	<i>H. suis</i>
24/30 (80%)	25/30 (83,3%)	0/30 (0%)	0/30 (0%)	0/30 (0%)	0/30 (0%)	0/30 (0%)	0/30 (0%)

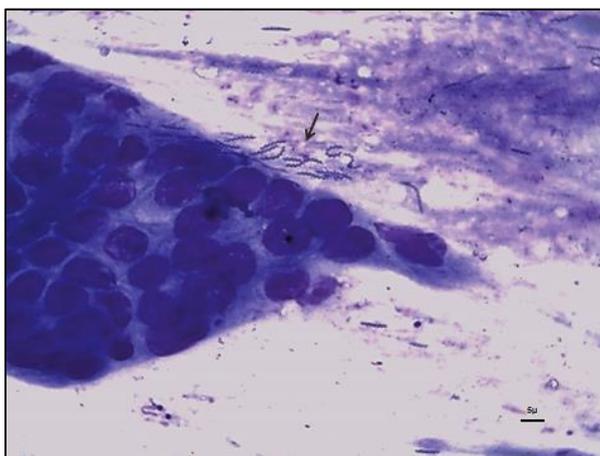
### PERROS

#### IMPRONTA:

En 28 de 30 improntas (93,3%) se observaron estructuras morfológicamente compatibles con *Helicobacter* spp., y no se observaron en 2 improntas (6,7%) (Tabla 6 - Figura 6).

**Tabla 6: Improntas de mucosa gástrica de perros**

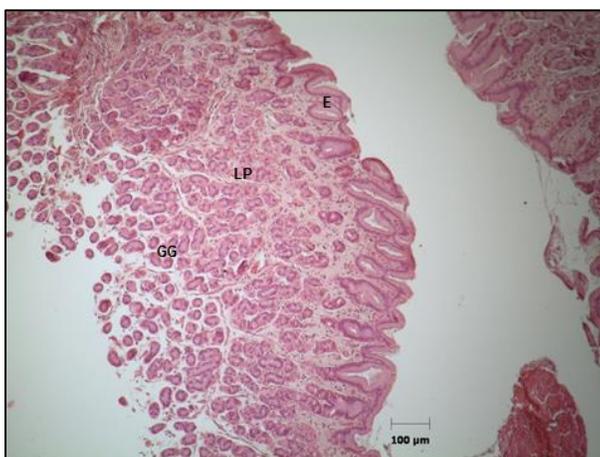
	Presencia <i>Helicobacter</i> spp.	Ausencia <i>Helicobacter</i> spp.
N° de muestras	28/30 (93,3%)	2/30 (6,7%)



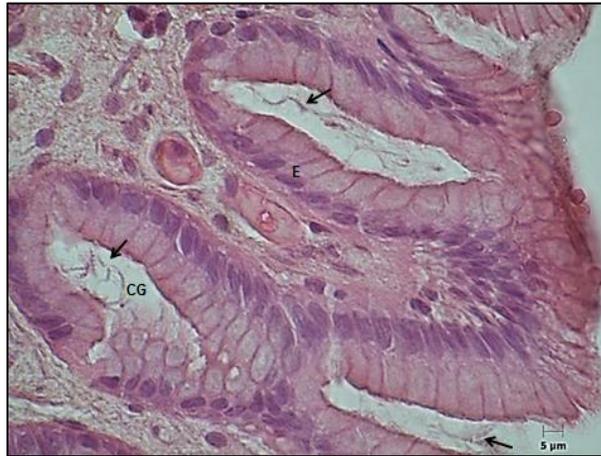
**Figura 6:** Impronta gástrica con estructuras compatibles con *Helicobacter* spp. (flecha) (May Grunwald Giemsa, 1000X).

#### HISTOPATOLOGÍA:

En el 100% de las histopatologías se observaron estructuras con morfología compatible con *Helicobacter* spp. (Figuras 7 y 8).



**Figura 7:** Corte histológico de biopsia gástrica de perro, región antral. E (epitelio), LP (lámina propia), GG (glándulas gástricas) (H/E, 100X).

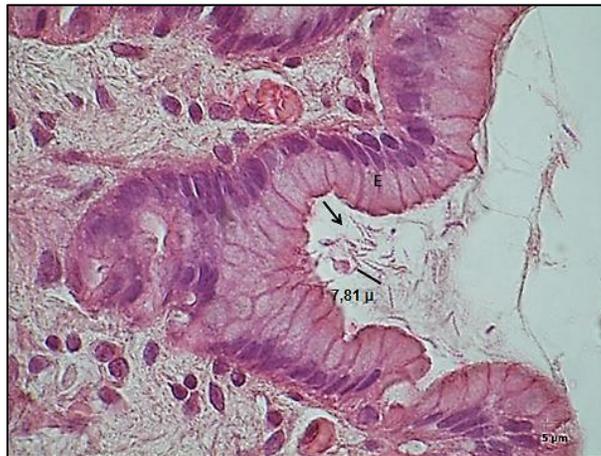


**Figura 8:** Microfotografía de biopsia gástrica de perro, región antral. Se observan estructuras con morfología compatible con *Helicobacter* spp. (flechas) en la superficie del epitelio gástrico (E) y en la cripta gástrica (CG) (H/E, 1000X).

De 30 perros estudiados, 7 (23,3%) tuvieron escasa cantidad de bacterias en la biopsia gástrica, 7 (23,3%) moderada cantidad, y 16 (53,4%) abundante cantidad (Tabla 7 - Figura 9).

**Tabla 7: Cantidad de bacterias en las histopatologías de las biopsias gástricas de perros**

	Escasa (hasta 10)	Moderada (de 10 a 50)	Abundante (más de 50)
N° de muestras	7/30 (23,3%)	7/30 (23,3%)	16/30 (53,4%)



**Figura 9:** Microfotografía de biopsia gástrica de perro, región antral. Se observan estructuras con morfología compatible con *Helicobacter* spp. (flecha) en la superficie del epitelio gástrico (E) y en el moco superficial (H/E, 1000X).

De los 7 perros que tenían escasa cantidad de bacterias en la biopsia gástrica, ninguno (100%) presentó alteraciones macroscópicas en la mucosa a la observación endoscópica. De los 7 perros que tenían moderada cantidad de bacterias, 4 (57,1%) no presentaron alteraciones en la mucosa y 3 (42,8%) sí. En cuanto a los 16 que tenían abundante cantidad de bacterias, 13 (81,3%) no presentaron alteraciones en la mucosa y 3 sí (18,7%) (Tabla 8 - Figuras 10 y 11).

**Tabla 8: Cantidad de bacterias en las histopatologías de las biopsias gástricas de perros y aspecto endoscópico de la mucosa**

Cantidad de bacterias en biopsia gástrica	Mucosa sin alteraciones endoscópicas	Mucosa con alteraciones endoscópicas
Escasa	7/7 (100%)	0/7 (0%)
Moderada	4/7 (57,1%)	3/7 (42,9)
Abundante	13/16 (81,3%)	3/16 (18,7%)



**Figura 10:** Vista endoscópica de la incisura angular del estómago de perro.

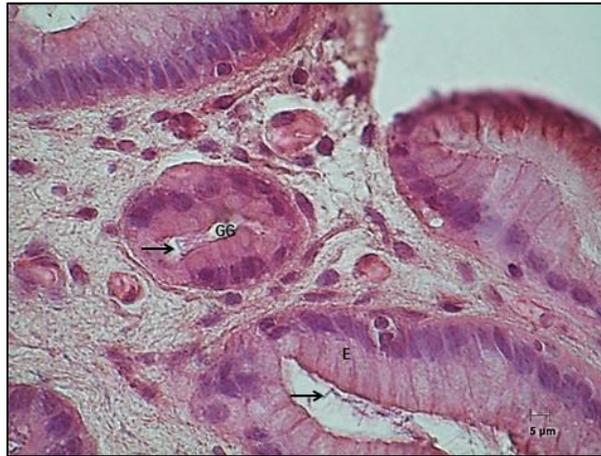


**Figura 11:** Vista endoscópica de la región del antro pilórico con abundante secreción gástrica.

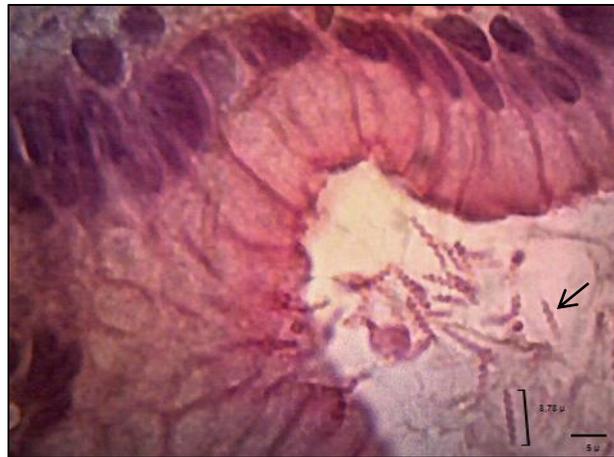
La mayoría de los perros que presentaban signos clínicos (80%) y la mayoría de los que no (76%), tenían de moderada a abundante cantidad de bacterias en las biopsias gástricas (Tabla 9 - Figuras 12 y 13).

**Tabla 9: Cantidad de bacterias en las histopatologías de las biopsias gástricas de perros y signos clínicos**

Cantidad de bacterias en biopsia gástrica	Presencia de signos clínicos	Ausencia de signos clínicos
Escasa	1/5 (20%)	6/25 (24%)
Moderada	2/5 (40%)	5/25 (20%)
Abundante	2/5 (40%)	14/25 (56%)



**Figura 12:** Microfotografía de biopsia gástrica de perro, región antral. Se observan estructuras con morfología compatible con *Helicobacter* spp. (flechas) en la superficie del epitelio gástrico (E) y en el interior de la glándula gástrica (GG) (H/E, 1000X).



**Figura 13:** Microfotografía de biopsia gástrica de perro. Estructuras con forma espiralada compatibles con *Helicobacter* spp. (flecha) en el moco superficial (H/E, 1000X).

Casi en la totalidad de los perros (96,7%), tanto en los que tenían signos clínicos como en los que no, el epitelio se encontraba sin alteraciones (Figuras 14 y 15), con excepción de 1 perro que presentaba marcada atrofia glandular, con hiperplasia del tejido como actividad reparadora.

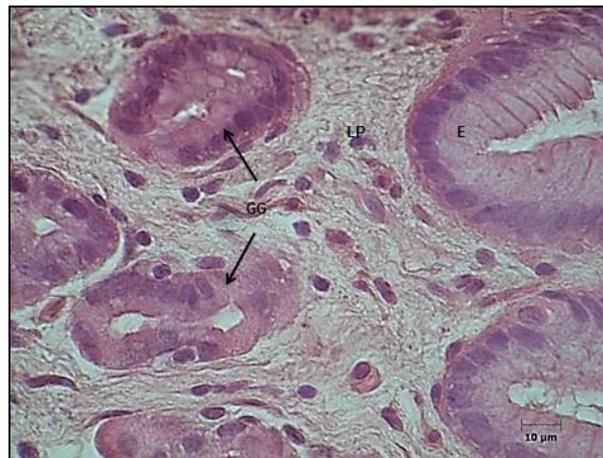
De los 25 perros que no tenían signos clínicos, todos (100%) tuvieron infiltración linfocitaria, 3 (12%) de forma leve, 13 (52%) moderada y 9 (36%) marcada; 23 perros (92%) tuvieron infiltración de células plasmáticas, 9 (39,1%) de forma leve, 9 (39,1%) moderada y 5 (21,8%) marcada.

En cuanto al tejido conectivo, 24 (96%) mostraron proliferación, 5 (20,8%) de forma leve, 11 (45,9%) de forma moderada y 8 (33,3%) marcada.

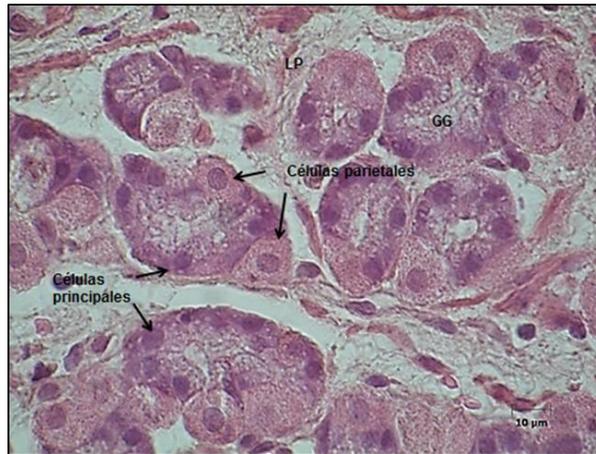
En cuanto a la mucosa, 19 (76%) tuvieron hiperemia, 10 (52,6%) en forma leve, 1 (5,3%) moderada, y 8 (42,1%) marcada; 9 (36%) tenían edema y 6 (24%) hemorragia de mucosa (Tabla 10). De los 25 perros, 4 (16%) tenían hiperemia marcada con edema, 3 (12%) hiperemia leve con edema y 2 (8%) tenían edema sin hiperemia, 4 (16%) tenían hiperemia marcada y hemorragia, y 2 (8%) hiperemia leve y hemorragia.

**Tabla 10: Hallazgos histopatológicos en perros sin signos clínicos**

Perros sin signos clínicos	
Alteraciones del epitelio	1/25 (4%) marcada atrofia glandular e hiperplasia del tejido
Infiltración linfocitaria	25/25 (100%)
Infiltración de células plasmáticas	23/25 (92%)
Proliferación de tejido conectivo	24/25 (96%)
Hiperemia de mucosa	19/25 (76%)
Edema de mucosa	9/25 (36%)
Hemorragia de mucosa	6/25 (24%)



**Figura 14:** Microfotografía de biopsia gástrica de perro, región antral. Se observa el epitelio (E), las glándulas gástricas (GG) y la lámina propia (LP) (H/E, 1000X).



**Figura 15:** Microfotografía de biopsia gástrica de perro, región fúndica. Se observa la lámina propia (LP), las glándulas gástricas (GG), las células parietales y las células principales (H/E, 1000X).

En los 5 perros (100%) que tenían signos clínicos, el epitelio se encontraba normal.

En todos los perros (100%) se encontró infiltración linfocitaria, en 1 (20%) de forma leve y en 4 (80%) de forma marcada.

En todos (100%) había proliferación de tejido conectivo, en 2 (40%) de forma leve y en 3 de forma marcada (60%).

En cuanto a la mucosa, ningún perro presentó hemorragia, 1 (20%) presentó edema y 4 perros (80%) tuvieron hiperemia, de estos, 2 (50%) hiperemia leve, 1 (25%) hiperemia moderada, y 1 (25%) hiperemia marcada (Tabla 11).

Hubo 4 perros en los que se encontraron abundante cantidad de eosinófilos, 2 en los que se observó hiperplasia de las células mucosas del cuello, y 1 en el que se encontraron polimorfonucleares neutrófilos.

**Tabla 11: Hallazgos histopatológicos en perros con signos clínicos**

Perros con signos clínicos	
Alteraciones del epitelio	0/5 (0%)
Infiltración linfocitaria	5/5 (100%)
Proliferación de tejido conectivo	5/5 (100%)
Hiperemia de mucosa	4/5 (80%)
Edema de mucosa	1/5 (20%)
Hemorragia de mucosa	0/5 (0%)

**PCR:**

De 30 perros estudiados, 23 (76,7%) resultaron positivos a *Helicobacter* spp., y la identidad de las especies fue determinada en el 45,8% de las muestras, 7 (23,3%) fueron positivas a *H. bizzozeronii* y 1 (3,3%) a *H. felis* mediante la PCR múltiple. Ninguna fue positiva a *H. pylori*, a *H. salomonis*, a *H. heilmannii*, a *H. cynogastricus* ni a *H. suis*. A las muestras positivas a *Helicobacter* spp. y negativas a todas las especies estudiadas se les realizó la PCR basada en el gen *ureAB*, y resultaron 1 (3,3%) positiva a *H. felis*, 2 (6,7%) a *H. salomonis* y 1 (3,3%) a *H. heilmannii*.

En el 54,2% de las muestras no se pudo determinar la especie mediante las PCRs especie específicas. De los perros que fueron positivos a la PCR género *Helicobacter* específica, 10 (33,3%) resultaron negativos a todas las especies estudiadas mediante las PCRs especie específicas y 4 (13,3%) fueron positivos a la PCR basada en el gen *UreAB* pero no se pudo determinar la especie por secuenciación. Por otra parte, 1 de los perros que fue negativo a la PCR género *Helicobacter* específica, resultó positivo a la PCR especie específica (Tabla 12).

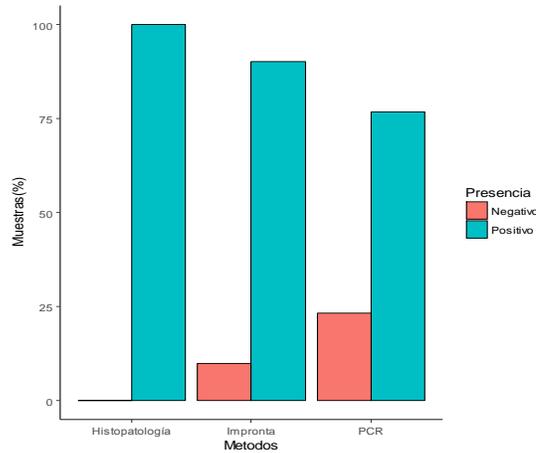
Una muestra presentó 100% de similitud con una secuencia recientemente publicada pero sin identidad de especie de un *Helicobacter* no cultivable, recuperado de una biopsia gástrica de un perro en Japón (datos no publicados).

**Tabla 12: Especies de *Helicobacter* encontradas en biopsias gástricas de perros determinadas por PCR**

<i>Helicobacter</i> spp.	<i>H. pylori</i>	<i>H. bizzozeronii</i>	<i>H. felis</i>	<i>H. salomonis</i>	<i>H. heilmannii</i>	<i>H. cynogastricus</i>	<i>H. suis</i>
23/30 (76,7%)	0/30 (0%)	7/30 (23,3%)	2/30 (6,7%)	2/30 (6,7%)	1/30 (3,3%)	0/30 (0%)	0/30 (0%)

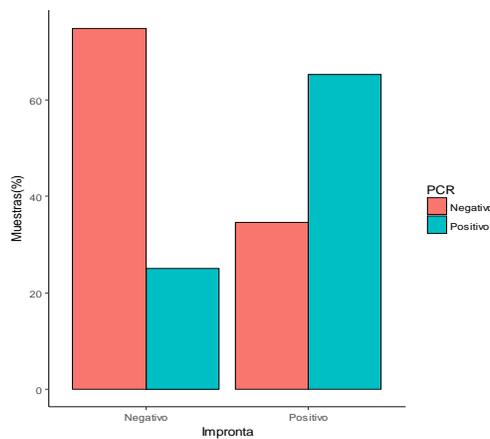
**Análisis estadístico de los datos:**

En la comparación de la capacidad de detección de bacterias a través de las tres técnicas utilizadas (impronta, histopatología y PCR), incluyendo los perros de las dos etapas (53 perros), hubo diferencia estadísticamente significativa entre ellas (valor  $p=0.0000001$ ) (Figura 16).



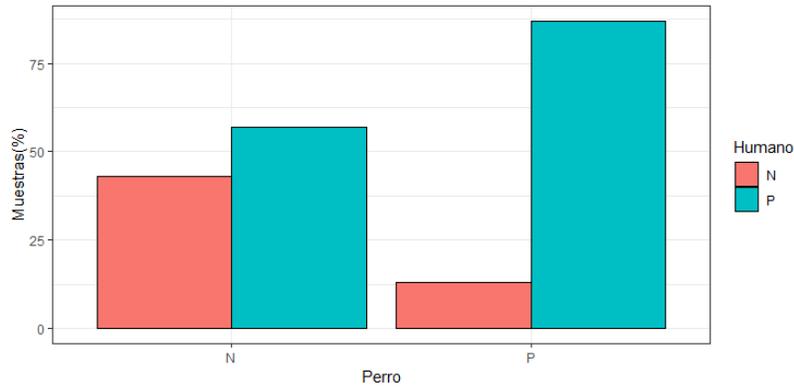
**Figura 16:** Porcentaje de muestras gástricas positivas y negativas a *Helicobacter* spp. mediante impronta, histopatología y PCR.

En la comparación de las técnicas de a pares, al evaluar la impronta y la PCR se detectó diferencia estadísticamente significativa entre estas técnicas respecto a la presencia de bacterias (valor  $p=0.0004$ ) (Figura 17).



**Figura 17:** Muestras gástricas positivas y negativas a *Helicobacter* spp. mediante impronta y PCR.

Mediante la regresión logística no se pudo determinar estadísticamente que la presencia de bacterias en el perro esté relacionada con la presencia de bacterias en el humano ( $p=0,10$ ) (Figura 18).



**Figura 18:** Perros y humanos positivos a *Helicobacter* spp. por PCR.

Si bien, gráficamente se puede observar mayor proporción de personas con la bacteria cuando está presente en el perro, y además el valor de OR es 5 con un IC95% (0,73-34,34), lo cual significa que el riesgo de presentar la bacteria en el humano es 5 veces más alto cuando está presente en el perro, esta conclusión no es significativa.

## CAPÍTULO IV

### DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

## DISCUSIÓN

### PERROS

#### Endoscopia:

##### *Aspecto endoscópico de la mucosa gástrica:*

En la primera etapa de estudio, el 71,4% de los perros analizados, con escasa cantidad bacteriana en la biopsia, no presentó alteraciones en la mucosa gástrica; el 50% con presencia de moderada densidad bacteriana manifestó visibles signos de alteración, y el 66,7% de los animales con abundante presencia bacteriana no mostró alteraciones endoscópicas de la mucosa. Lo mismo sucedió con los perros de la segunda etapa, ya que, los que tenían escasa cantidad de bacterias, no tenían alteraciones en la mucosa; 57,1% con moderada cantidad, no tuvo signos visibles; y la mayoría (81,3%) de los perros con abundante presencia bacteriana no presentaba alteraciones endoscópicas de la mucosa. Estos hallazgos concuerdan con Paz Zúñiga (2002), quien no encontró alteraciones evidentes en la mucosa gástrica a la observación endoscópica de la mayoría de los perros estudiados. Asimismo, Neiger *et al.* (1999) en un estudio realizado sobre 20 perros Beagle infectados y con hallazgos histológicos de gastritis, pero clínicamente sanos, no encontraron alteraciones en el aspecto endoscópico de la mucosa, aunque en otro grupo de 39 perros infectados, en 34 no encontraron alteraciones, pero en 5 observaron erosiones y también hemorragias en la mucosa en 2 de ellos. Thibaut *et al.* (2007) estudiaron 29 perros, de los cuales, la mayoría no evidenció alteraciones de la mucosa; en el 17,2% (5/29) se observó enrojecimiento de la misma, abundante cantidad de mucus en el 20,7% (6/29), edema de la superficie gástrica en el 6,9% (2/29) y ninguno evidenció erosiones o úlceras.

Estos hallazgos demuestran que no en todos los casos las lesiones gástricas están directamente relacionadas con la presencia y cantidad de bacterias por muestra, aunque no todos los investigadores acuerdan con esto, ya que por ejemplo Simpson y Burrows (1999), en el estudio endoscópico de estómagos con gran número de bacterias observaron zonas hiperémicas y gran cantidad de mucus. Asimismo, Yamasaki *et al.* (1998) detectaron alteraciones de la superficie de la mucosa gástrica con irregularidades de la misma en 20 y 25% de perros infectados, clínicamente sanos y enfermos, respectivamente. Toledo Vieira *et al.* (2012) en un estudio sobre 60 perros, encontraron 96,7% de presencia de bacterias NHPH, y observaron alteraciones macroscópicas de la mucosa gástrica en 38,3% de los perros; hiperemia en el 30%, hemorragias petequiales en el 5% y erosiones y úlceras en el 6,7%. El 100% de los perros que tenían úlceras, el 66,7% de los que tenían hemorragias petequiales y casi el 90% de los que tenían mucosa hiperémica estaban colonizados por especies NHPH.

Se concluye que la apariencia de la mucosa gástrica a la observación endoscópica no guarda relación con la presencia o ausencia de bacterias, con la cantidad de las mismas, ni con la presencia o no de signos histológicos de gastritis, por lo cual, independientemente del aspecto de la mucosa gástrica, siempre es necesario tomar muestras para realizar el estudio histopatológico para comprobar la presencia o no de bacterias y de alteraciones del tejido.

### **Impronta:**

En un alto porcentaje de las improntas realizadas a partir de las biopsias gástricas de los perros de la primera y de la segunda etapa se encontraron estructuras compatibles con *Helicobacter* spp. (92,3% y 93,3% respectivamente), en las cuales la cantidad de bacterias presentes fue abundante. Estos resultados coinciden con los encontrados por Debongnie *et al.*, 1994, Debongnie *et al.*, 1995 y Neiger *et al.*, 2009 quienes describen que la observación de las improntas teñidas con Gram o Diff Quik, es un excelente método para la detección de estas bacterias por microscopía óptica y han demostrado ser más sensibles que la observación histológica de la biopsia gástrica.

El examen de la impronta se pudo realizar en forma inmediata a la toma de muestra realizando tinciones rápidas (tipo Romanovsky), y las características morfológicas de estas bacterias espiraladas se reconocieron fácilmente, aunque sin identificar la especie.

Si bien la impronta resultó ser un excelente método para la detección de estas bacterias, ya que fueron identificadas en 92,9% (52/56) de las improntas de los perros de la primera y de la segunda etapa, con la histopatología se detectaron en todas las muestras 100% (56/56), en contraste con Debognie *et al.* (1995) quienes comunicaron que la impronta resultó ser más sensible que la observación histológica de las biopsias gástricas. Esto podría deberse a que en esos casos particulares donde la impronta resultó negativa, la muestra fue tomada de una zona donde no se encontraban bacterias, dada su distribución en parches sobre la mucosa, tal como lo describieron Hirschl y Makristathis (2007) y Lottspeich *et al.* (2007).

En conclusión, si bien la histopatología es la técnica de detección de bacterias NHPH más confiable y sensible, la impronta es un método muy sencillo que permite detectarlas fácilmente y en forma rápida.

## Histopatología:

### *Tinciones:*

Las bacterias gástricas fueron reconocidas fácilmente en los cortes histológicos teñidos con H/E. Si bien Laine *et al.* (1997) describieron que con Giemsa se pueden ver más fácilmente los *Helicobacter* que con H/E, se optó por esta última coloración, teniendo en cuenta que permite, además, observar las alteraciones del tejido. Estaba prevista la realización de la coloración de Warthin-Starry a las muestras donde con las tinciones tradicionales no se observaran bacterias con características morfológicas compatibles con especies NHPH, ya que es una tinción descrita como más satisfactoria para la observación de organismos espiralados, pero dado que no hubo dificultad en la visualización, no fue necesario realizar esta coloración argéntica.

### *Cantidad de bacterias:*

En cuanto a la cantidad de bacterias en las biopsias gástricas, 25% (14/56) de los perros de la primera y de la segunda etapa tuvieron escasa cantidad de bacterias, 30,4% (17/56) moderada cantidad y 44,6% (25/56) abundante. No hay una escala estandarizada para categorizar la cantidad de bacterias por muestra, por lo cual se creó una escala *ad hoc* en forma arbitraria, semejante a la utilizada por otros investigadores (Handt, 1994; Happonen *et al.*, 1996) para la evaluación histológica de las biopsias gástricas.

En este estudio, de los 56 perros, sólo 11 tenían signos clínicos gastroentéricos, de los cuales la mayoría presentaba de moderada a abundante cantidad de bacterias en la mucosa gástrica. De igual modo, la mayoría de los perros sin signos clínicos, también tenían de moderada a abundante cantidad de bacterias y sólo unos pocos presentaron escasa cantidad.

Estos hallazgos coinciden con lo manifestado por Eaton *et al.* (1996), quienes evaluaron la presencia de bacterias gástricas espiraladas en 54 perros (31 de laboratorio, 8 de un albergue y 15 con afección gastrointestinal), y encontraron, tanto en los perros clínicamente sanos como en los enfermos, de moderada a gran cantidad de bacterias ubicadas en las glándulas gástricas y sobre la superficie epitelial, y escasas bacterias en algunos perros con enfermedad de origen extra gástrico. También Happonen (1998), en 56 perros, 35 clínicamente sanos y 21 con signos gastrointestinales, encontró un grado moderado a marcado de colonización en ambos grupos.

Paz Zúñiga (2002) determinó el grado de infección en el examen histológico de 28 muestras de perros, sin discriminar entre sanos y enfermos, obteniendo un alto porcentaje de casos con marcada infección, 57,1% en la zona fúndica y 44% en la zona del antro pilórico. Jara Verdugo (2003) en un estudio donde determinó la presencia de estas bacterias en estómago, intestino,

hígado y vesícula biliar de 34 perros, encontró particularmente en estómago, abundante cantidad de bacterias, aunque tampoco diferenció entre sanos y enfermos. Robić *et al.* (2007) determinaron el número de bacterias NHPH en muestras de estómago de 20 perros clínicamente sanos y encontraron un gran número de bacterias, especialmente sobre la superficie mucosa, pero también en el lumen de las glándulas gástricas, en la profundidad de la mucosa gástrica y en algunos casos, en la submucosa. En un solo caso encontraron gastritis ulcerosa, aunque el número de bacterias NHPH no fue mayor que en otros animales, por lo que se infirió que la presencia de estas bacterias no fue la causa de las úlceras. Por otro lado, Thibaut *et al.* (2007), encontraron en 25 muestras de perros, sin discriminar entre sanos y enfermos, que el 85,7% de las de la zona fúndica y el 68% de las del antro, presentaron de moderado a marcado grado de infección.

De acuerdo a lo hallado en este trabajo y en concordancia con otras investigaciones realizadas, se concluye que la cantidad de bacterias encontradas en la mayoría de los casos es de moderada a abundante, y que no hay diferencia en cuanto a la cantidad de bacterias encontradas en animales sanos y con enfermedad gastrointestinal.

#### *Hallazgos histopatológicos:*

En este estudio no se encontraron alteraciones del epitelio en la mayoría de los perros, tanto en los que tenían signos clínicos como en los que no, pero hubo de leve a marcada infiltración linfocitaria. Amorim *et al.* (2015) en cambio, encontraron además de infiltración linfocitaria, de leve a moderada injuria epitelial gástrica.

Las células inflamatorias que se encontraron en la lámina propia fueron linfocitos, células plasmáticas y, en menor medida, neutrófilos y eosinófilos. Hubo en algunos casos hiperplasia de las células mucosas del cuello y, en otros, degeneración glandular. Estos hallazgos son similares a los de Hermanns *et al.* (1995), quienes encontraron que la degeneración glandular era generalmente acompañada por acumulación de linfocitos y, en menor grado, por la presencia de granulocitos neutrófilos.

Los diferentes autores refieren presencia de linfocitos y de células plasmáticas y en la mayoría de los casos gastritis crónica leve (Weber *et al.*, 1958; Henry *et al.*, 1987; Lee *et al.*, 1992; Geyer *et al.*, 1993; Handt *et al.*, 1994; Hermanns *et al.*, 1995), aunque en un estudio hecho por Happonen *et al.*, (1996) si bien todos los perros tuvieron gastritis crónica leve, en algunos se encontró gastritis activa leve, conjuntamente con gastritis crónica. Fox *et al.* (1991), Handt *et al.* (1994) y Happonen (1996) sugieren que los neutrófilos no juegan un rol importante en la gastritis canina, lo cual coincide con nuestro trabajo, en el cual estas células fueron observadas en escasa cantidad.

En acuerdo con estudios previos, las bacterias NHPH fueron observados en este trabajo en el mucus superficial y dentro de las glándulas gástricas (Happonen *et al.*, 1996; Wiinberg *et al.*, 2005; Amorim *et al.*, 2015).

En cuanto a la relación entre la cantidad de bacterias y los hallazgos histopatológicos, alrededor del 45% de los perros tenían abundante cantidad de bacterias, de los cuales la mayoría (86,6%) presentó un grado moderado a marcado de gastritis, evidenciado por la presencia de células plasmáticas y moderada a marcada infiltración linfocitaria. De los que tuvieron escasa cantidad de bacterias, la mayoría tuvo una gastritis de moderada a marcada. Si bien varios investigadores informaron la existencia de una correlación entre la infección con especies NHPH y patología gástrica (Henry *et al.*, 1987; Lee, 1989; Lee *et al.*, 1992; Lecoindre *et al.*, 1995), Eaton *et al.* (1996) no pudieron establecer una relación significativa entre ambas, y Hermanns *et al.* (1995) y Yamasaki *et al.* (1998) informaron la ausencia de tal correlación.

No se conoce claramente la acción patógena que tienen las especies NHPH en la mucosa gástrica del perro, aunque pareciera ser de importancia debido a las lesiones que se observan en las células parietales infectadas. Por otra parte, tampoco se sabe acerca de las diferencias en la patogenicidad que podrían tener las distintas cepas de una misma especie de NHPH (Weber *et al.*, 1958; Henry *et al.*, 1987; Geyer *et al.*, 1993; Hermanns *et al.*, 1995).

En cuanto a la relación entre la especie bacteriana y los hallazgos histopatológicos, de los perros infectados con *H. bizzozeronii*, los que tenían de moderada a abundante cantidad de bacterias, tenían de moderada a marcada infiltración linfocitaria, infiltración de células plasmáticas, marcada proliferación de tejido conectivo y algunos tenían hiperemia. Los que tenían escasa cantidad de bacterias, tuvieron de moderada a marcada infiltración linfocitaria, leve infiltración de células plasmáticas y de moderada a marcada proliferación de tejido conectivo subepitelial. Ninguno de los portadores de esta especie tuvo signos clínicos.

Dos perros tuvieron *H. felis*, uno con moderada cantidad de bacterias y con signos clínicos gastrointestinales y otro con abundante cantidad de bacterias pero sin signos clínicos. En la histopatología ninguno presentaba alteraciones del epitelio, tenían de moderada a marcada infiltración linfocitaria y de células plasmáticas, y de moderada a marcada proliferación de tejido conectivo e hiperemia. A pesar de tratarse de sólo dos perros, esto acuerda con Diker *et al.* (2002) quienes manifestaron que *H. felis* sólo se ha encontrado en perros con gastritis crónica y no en perros con histología gástrica normal. Lee *et al.* (1992) observaron hiperplasia linfoide en las zonas subglandulares y a veces entre las glándulas luego de la infección experimental con *H. felis*, aunque, Simpson *et al.* (2000) encontraron un grado similar de inflamación en perros infectados experimentalmente con *H. felis* y en perros controles no infectados.

Ninguno de los dos que tenían *H. salomonis* presentaban signos gastrointestinales, ambos tenían abundante cantidad de bacterias, con moderada infiltración linfocitaria, de leve a moderada infiltración de células plasmáticas, de moderada a marcada proliferación de tejido conectivo, y uno de ellos, marcada hiperemia. Amorim *et al.* (2015) informaron gastritis leve, con leve injuria epitelial, fibrosis e infiltración linfocítica.

En conclusión, los hallazgos histopatológicos más frecuentes fueron infiltración linfocitaria, presencia de células plasmáticas y proliferación de tejido conectivo; la hiperemia, el edema y la hemorragia se presentaron en algunos casos y fibrosis en pocos. La mayoría de los perros tenían de moderada a abundante cantidad de bacterias y signos histológicos de gastritis crónica leve, por lo que las bacterias no causarían alteraciones histológicas importantes. Quizás algunos animales en forma individual sean más susceptibles a presentar alteraciones en la mucosa o alguna especie o cepa de una misma especie bacteriana pueda inducir diferentes alteraciones histopatológicas.

La mayoría de los perros en este estudio eran clínicamente sanos, por consiguiente, pareciera que la presencia de bacterias NHPH no tendría significancia clínica en perros sanos, a pesar de la presencia histológica de una gastritis crónica, por lo tanto el grado de colonización de NHPH no estaría directamente relacionado con los cambios histopatológicos, ni con la presencia de signos clínicos.

#### **Prevalencia:**

En cuanto a la prevalencia determinada mediante histopatología, en el 100% de los perros estudiados (56/56), tanto en los de la primera etapa, algunos de los cuales no tenían propietario, como en aquellos de la segunda etapa, todos con dueño, y tanto en los que presentaban signos clínicos gastrointestinales (11/56) como en los que no (45/56), se encontraron estructuras morfológicamente compatibles con bacterias NHPH. A pesar de que la prevalencia podría variar según el área geográfica estudiada, este hallazgo acuerda con los antecedentes bibliográficos de estudios realizados en otras partes del mundo, que informan que estas bacterias se encuentran frecuentemente en el perro, siendo casi universal su presencia en la mucosa gástrica. Así, ya desde las primeras investigaciones al respecto hasta los últimos trabajos publicados, los porcentajes de bacterias NHPH encontradas, no han variado significativamente.

En este estudio la prevalencia encontrada en animales sanos fue de 100% (45/45), porcentaje encontrado también por Weber *et al.* (1958), quienes detectaron especies NHPH en todos los perros adultos normales estudiados y por Henry *et al.* (1987) que hallaron una tasa de infección del 100% en Beagles de laboratorio. Eaton *et al.* (1996) también evaluaron la prevalencia de las bacterias gástricas espiraladas mediante histopatología en 39 animales clínicamente sanos de

laboratorio y de refugio, encontrándolas en el 100% de los perros. Happonen (1998) detectó especies NHPH en el 100% de los perros sanos (n=25) y Cattoli *et al.* (1999) encontraron en el estudio de las biopsias gástricas de perros sanos, 100% (15/15) de positivos a estructuras compatibles con bacterias NHPH. Sin embargo, Yamasaki *et al.* (1998), informaron mediante histología, una prevalencia del 61%, mucho menor a la documentada por el resto de los investigadores. Por los resultados del presente estudio y lo comunicado por la mayoría de los autores, a excepción de Yamasaki *et al.* (1998), las bacterias NHPH en perros sanos se encuentran en un 100% de los casos investigados mediante histología.

Porcentajes similares fueron encontrados por otros autores que realizaron el estudio de prevalencia de especies NHPH mediante histopatología, aunque en perros de procedencia desconocida y por lo tanto sin antecedentes de su historia clínica. Así Paz Zúñiga (2002), obtuvo una frecuencia de presentación del 100% en un estudio sobre 29 perros, Jara Verdugo (2003) encontró en 34 perros, una frecuencia de presentación de 94,1%, De Toledo Vieira *et al.* (2012) en 60 perros detectaron la bacteria en el 96,7% de los animales y Okubo *et al.* (2017) en 96 perros, reportaron una prevalencia de 100%. Por lo tanto, en estos casos en los que no se conocía si los animales eran sanos o enfermos, la prevalencia también fue cercana al 100%.

En cuanto a los perros de este estudio que presentaban signos de enfermedad gastrointestinal, en el 100% (11/11) se visualizaron bacterias NHPH mediante histopatología. Los porcentajes encontrados por otros autores en estudios sobre prevalencia de NHPH detectadas por histopatología en animales enfermos con signos digestivos es variable, y oscila entre 61% y 95%. Geyer *et al.* (1993) encontraron una frecuencia de bacterias NHPH de 73,8%; Hermanns *et al.* (1995) en el 82% de 122 biopsias, Eaton *et al.* (1996) en el 67% de 15 perros y Yamasaki *et al.* (1998) en el 61% de 56 perros y reportaron además, que la prevalencia en perros con signología clínica no fue significativamente mayor que en los clínicamente sanos (86%). Happonen (1998) en un estudio sobre 21 perros, encontró bacterias NHPH en el 95% de los mismos; Cattoli *et al.* (1999) en un 80% de perros (8/10) y Diker *et al.* (2002), en un 84,4% de 122 perros eutanasiados por diferentes enfermedades. A pesar de que hubo diferencias en la prevalencia encontrada en perros con signos clínicos en este estudio con respecto a otros autores, de todas maneras, los porcentajes reportados por ellos es alto, superando en todos los casos el 60%.

Se concluye que la prevalencia encontrada por histopatología, tanto en animales sanos como en aquellos con signos gastrointestinales, es alta.

La prevalencia de especies NHPH encontrada en perros mediante PCR fue del 80%; en perros con signos clínicos de patología digestiva fue también del 80% y en perros sin signos del 76%.

Neiger *et al.* (1999), en Suiza, encontraron especies NHPH en el 100% de 20 perros Beagle clínicamente sanos; Nam y Kim (2000), en el 88,5% de 87 perros, y Hwang *et al.* (2002) determinaron la prevalencia de infección en 40 perros sanos, aunque realizaron el estudio por zona del estómago, por lo cual no informan la prevalencia total, pero resultó de 67,5% en el fundus, de 77,5% en el cuerpo y 67,5% en el antro.

Neiger *et al.* (1999), Hwang *et al.* (2002) y Van den Bulck *et al.* (2005 a) estudiaron mediante PCR la presencia de bacterias NHPH en 45, 28 y 100 perros con signos clínicos y encontraron una prevalencia de infección del 89, 100 y 71,8% respectivamente. Wiinberg *et al.* (2005) analizaron muestras gástricas de 22 perros con signos gastrointestinales crónicos en Dinamarca, y encontraron especies NHPH en 76,7% de los perros.

Tanto en los perros con signos clínicos como en los sanos, la prevalencia encontrada en este trabajo fue alta, similar a lo reportado por todos estos autores, a excepción de Amorim *et al.* (2015), quienes analizaron muestras gástricas de 69 perros en Portugal y detectaron bacterias NHPH mediante PCR en el 47,8% de los perros, algunos sanos y otros con diferentes patologías.

De acuerdo a estos resultados, se deduce que las bacterias NHPH no están asociadas a la presencia o ausencia de signos clínicos, ya que la mayoría de los animales sanos fueron portadores de estas bacterias.

#### **Raza, sexo, edad:**

En este estudio, estas bacterias fueron encontradas en perros de todas las edades, de ambos sexos, y en mestizos y de razas puras. Esto coincide con lo comunicado por Happonen (1996), quien encontró igual prevalencia en perros de distintas edades, de ambos sexos y además no encontró asociación entre la edad y la densidad de colonización.

Neiger (1999), Paz Zúñiga (2002) y Okubo *et al.* (2017) también encontraron una distribución homogénea de los animales en cuanto al sexo, ya que tanto los machos como las hembras presentaban bacterias de forma similar, y con respecto a la edad, estudiaron animales en un rango de 1 a 16 años y encontraron positividad para las bacterias en todos los grupos. En cambio, Dicker *et al.* (2002) observaron que la colonización de la mucosa gástrica por especies NHPH aumentaba con la edad y Jara Verdugo (2003) encontró un leve predominio de hembras positivas a NHPH y la mayor proporción de animales positivos estuvo en el grupo etario menor a 1 año y mayor a 5 años. Los animales menores de un año resultaron positivos a la bacteria en un 100% en la mayoría de las muestras estudiadas, por lo que la frecuencia de presentación fue alta en cachorros lactantes, lo que se podría explicar por la transmisión desde la madre durante el período de lactancia.

En un trabajo previo realizado por la autora de esta tesis (Guendulain *et al.*, 2017), se detectó una prevalencia cruda de especies NHPH en 50 perros muestreados a través de PCR del 58% (29/50) - IC 95: 43,3-72,7%-; el 68,9% fueron perros mestizos y 31,1% fueron de raza pura, el 65,5% machos y 34,5% hembras, de los cuales el 48,3% eran perros menores de 3,8 años de edad y el 51,7% mayores.

Según los resultados obtenidos en este estudio, y en concordancia con la mayoría de los autores, se concluye que la presencia de especies NHPH sería independiente de la raza, del sexo y de la edad de los perros.

#### **Estilo de vida:**

Los perros de la primera etapa que participaron de este estudio, residían en una zona urbana con una población canina numerosa, con alta densidad de perros callejeros y por lo tanto con alta probabilidad de contacto entre ellos, debido a que la mayoría permanecía mucho tiempo en la vía pública. A pesar de ello, no se encontraron diferencias en las prevalencias de infección entre perros con propietarios con salidas controladas y perros de vida libre.

Algunos autores (Paz Zuñiga, 2002; Thibaut *et al.*, 2007) sugieren que las altas frecuencias de especies NHPH podrían deberse a que los perros estudiados, si bien tenían propietario, permanecían la mayor parte del tiempo en la vía pública, posibilitando el contacto entre animales y facilitando la transmisión de la bacteria. Sin embargo, en el presente estudio, la alta prevalencia se encontró tanto en perros de vida libre, como en perros con salidas limitadas. Estos autores sugieren también, que la infección podría ser adquirida durante el periodo de lactancia, siendo la madre el reservorio en la transmisión, dado que se han encontrado en perros menores al año de edad (Hänninen *et al.*, 1998). Esto último podría explicar la presencia de especies NHPH en perros sin acceso al exterior.

Teniendo en cuenta la forma de transmisión de las bacterias NHPH, se podría inferir que los perros que viven en la calle o que tienen acceso a la vía pública y por lo tanto mayor contacto con otros perros, podrían tener mayor prevalencia de infección por especies NHPH, sin embargo, no se han encontrado resultados que avalen esta teoría, por el contrario, no se hallaron diferencias entre los perros que residían en la vía pública, de aquellos con propietario y sin salida al exterior.

**PCR:**

*Especies encontradas:*

La prevalencia total encontrada en perros en este trabajo mediante PCR fue del 80% y el género *Helicobacter* fue identificado en el 76,7% de los perros, lo cual concuerda con estudios previos (Yamasaki *et al.*, 1998; Wiinberg *et al.*, 2005). Hubo muestras que resultaron negativas en la PCR a pesar de haberse observado en la histopatología estructuras con morfología característica de *Helicobacter* spp., lo que podría deberse probablemente, a que la muestra para PCR fue tomada de un lugar donde no había bacterias, dada su distribución irregular en la mucosa, a la degradación del ADN durante la conservación de las muestras o a la presencia de inhibidores de la PCR (Schrader *et al.*, 2012)

La identidad de las especies de *Helicobacter* fue determinada en el 45,8% de las muestras positivas al género *Helicobacter*, a diferencia de Wiinberg *et al.* (2005) quienes pudieron identificar las especies en el 82% de los perros. En otros estudios se ha reportado que en más del 50% de los perros positivos no se pudo identificar la especie (Eaton *et al.*, 1996; Jalava *et al.*, 1998; Neiger *et al.*, 1999), tal como lo sucedido en esta investigación, donde en el 54,2% de las muestras no se pudo determinar la especie mediante las PCRs especie específicas. De los perros que fueron positivos a la PCR género *Helicobacter* específica, el 33,3% resultó negativo a todas las especies estudiadas mediante las PCRs especie específicas y el 13,3% fue positivo a la PCR basada en el gen *UreAB* pero no se pudo determinar la especie por secuenciación. Por otra parte, 1 de los perros que fue negativo a la PCR género *Helicobacter* específica, resultó positivo a la PCR especie específica, lo cual indica que la realización de más de una técnica molecular aumenta las probabilidades de detección de la bacteria.

En este estudio no se encontró *H. pylori* en las muestras de perros, en coincidencia con los reportes bibliográficos (Weber *et al.*, 1958; Henry *et al.*, 1987; Geyer *et al.*, 1993; Hermanns *et al.*, 1995), a pesar de que Buczolits *et al.* (2003) en Austria, informaron el hallazgo de esta especie mediante la secuenciación parcial del gen *16S ARNr* en muestras gástricas de 2 de 4 perros estudiados, aunque no lograron su aislamiento. Los autores sugirieron que quizás la mucosa gástrica canina no sea un ambiente favorable para la supervivencia de *H. pylori*, y que entonces no se habría podido realizar su aislamiento debido a que en estas condiciones desfavorables puede cambiar su forma de espiralada a cocoide, y estas formas cocoides son viables pero no cultivables. Posteriormente, Astudillo Vergara (2009) en Chile y Ülgen *et al.* (2016) en Turquía, también comunicaron el hallazgo de esta especie en unos pocos perros. Sin embargo, consideran la posibilidad de que sea una especie muy estrechamente relacionada, con moderada similitud a *H.*

*pylori*, con 96.6%-98% de identidad genética. Por lo tanto, el riesgo de infección de perros con *H. pylori* podría ser mayor en países donde la misma es más prevalente en humanos.

Por otro lado, *H. pylori* fue aislado solamente de primates no humanos y de felinos domésticos (Handt *et al.*, 1994; Handt *et al.* 1997). Fox *et al.* (1995) lograron infectar experimentalmente a gatos domésticos con *H. pylori* y aislar la bacteria de saliva y secciones gástricas y encontrar ADN de *H. pylori* en heces felinas y placa dental. No existen reportes similares en perros.

De los 30 perros de la segunda etapa estudiados en el presente trabajo de tesis doctoral, 23 (76,7%) resultaron positivos a *Helicobacter* spp., de los cuales 7 (23,3%) fueron positivos a *H. bizzoeronii*, 2 (6,7%) a *H. felis*, 2 (6,7%) a *H. salomonis*, 1 (3,3%) a *H. heilmannii*, y ninguno a *H. cynogastricus* y a *H. suis*. De los perros que fueron positivos a la PCR género *Helicobacter* específica, 11 (36,7%) fueron negativos a la PCR especie específica, probablemente por no tratarse de alguna de las especies estudiadas.

En relación a las especies de NHPH, en los perros estudiados se observó un predominio de *H. bizzoeronii* (7/30), lo que guarda relación con lo descrito por Neiger *et al.* (1999), Baele *et al.* (2004), Priestnall *et al.* (2004), Van den Bulck *et al.* (2005) y Wiinberg *et al.* (2005), quienes afirman que *H. bizzoeronii* es la especie que predomina en la mucosa gástrica del perro. Hwang *et al.* (2002) y Amorim *et al.* (2015), en cambio, encontraron como especie más prevalente a *H. heilmannii*, sin embargo los primeros sólo estudiaron dos especies, *H. heilmannii* y *H. felis*, y los segundos encontraron que los amplicones obtenidos en la PCR específica para *H. heilmannii* sólo mostraron un 92% de homología con *H. heilmannii*, por lo que fueron reclasificados como *H. heilmannii*-like. Estas especies podrían ser una variante de *H. heilmannii* adaptada al huésped o ser una nueva especie. Por otro lado, si bien Wiinberg *et al.* (2005) encontraron a *H. bizzoeronii* como la especie más prevalente, destacaron que *H. heilmannii* fue la segunda especie más frecuentemente hallada.

*H. felis* se encontró en un número limitado de perros (2/30), en concordancia con otros investigadores como Neiger *et al.* (1999), Hwang *et al.* (2002), Priestnall *et al.* (2004), Amorim *et al.* (2015) y Wiinberg *et al.* (2005), quienes encontraron *H. felis* en pocos estómagos caninos y a diferencia de lo comunicado por Van den Bulck *et al.* (2005 a), quienes encontraron esta especie en más del 50% de los perros belgas investigados. Dado que las secuencias de los genes 16S ARNr de *H. bizzoeronii*, *H. felis* y *H. salomonis* tienen 99% de semejanza, la determinación de esta secuencia no es suficiente para la identificación de especies. Por este motivo estos autores utilizaron la tDNA-PCR que amplifica los espacios intergénicos tRNA y produce patrones de electroforesis específicos de especie, permitiendo la identificación por comparación con una base de datos.

*H. salomonis* también se encontró en pocos perros (2/30), en uno de los casos acompañado por *H. bizzozeronii*. Van den Bulck *et al.* (2005 a) también lo encontraron en baja proporción y en combinación con otras especies, Amorim *et al.* (2015), en cambio, encontraron a *H. salomonis* como la segunda especie más prevalente y en el 42% de los casos junto con otras especies.

Pareciera que el hallazgo del tipo de especie de NHPH varía con la zona geográfica estudiada, así en Finlandia, Suiza, Estados Unidos y Dinamarca *H. bizzozeronii* y *H. salomonis* fueron las más comúnmente encontradas, seguidas por *H. felis* y *H. heilmannii* (Jalava *et al.*, 1998; Priestnall *et al.*, 2004; Wiinberg *et al.*, 2005). En Bélgica (Van den Bulck *et al.*, 2005 a), *H. bizzozeronii* también fue la especie más prevalente, pero *H. felis* y *H. heilmannii*-like fueron esporádicamente encontradas, mientras que en Portugal la de mayor prevalencia fue *H. heilmannii*-like.

La infección mixta de dos o más especies en forma conjunta, no fue un hallazgo frecuente en esta investigación, a diferencia de la mayoría de los demás trabajos, donde lo informan como característica de la infección con estas bacterias (Neiger, 1999; Amorim *et al.*, 2015). La bibliografía cita diferentes combinaciones, sobre todo en el caso de *H. salomonis* que siempre se ha encontrado en forma conjunta con otra especie y nunca en infección única. En esta investigación, si bien se ha encontrado una infección mixta de *H. bizzozeronii* y *H. salomonis*, también hubo un caso en que *H. salomonis* fue encontrado como infección única.

En conclusión, los perros de este estudio fueron colonizados por una variedad de especies de *Helicobacter*, siendo *H. bizzozeronii* la más prevalente. De acuerdo a estos resultados y a los datos de la bibliografía, esta especie no sólo es la más frecuentemente encontrada en perros, sino que además los porcentajes son, en general, elevados. *H. felis* es otra de las especies que se encuentra comúnmente, aunque en porcentajes bajos, generalmente inferiores al 10%. Algunos autores comunican el hallazgo de *H. heilmannii*, que incluye en algunos casos, a las especies conocidas como *H. heilmanni* tipo II, tales como *H. bizzozeronii*, *H. felis* y *H. salomonis* lo que podría explicar los bajos porcentajes comunicados de *H. salomonis* y altos porcentajes de *H. heilmannii*.

Las especies NHPH tienen una alta prevalencia y una distribución mundial, *H. bizzozeronii* es la más prevalente y las demás especies muestran algunas diferencias de presentación según la región geográfica.

## HUMANOS

### Prevalencia:

La prevalencia hallada en humanos mediante PCR a nivel de género fue del 80%, mientras que para *H. pylori* fue del 83,3%. No se detectaron resultados positivos para las restantes especies bacterianas estudiadas. Esto coincide con los datos aportados por la bibliografía en cuanto a que la especie que predomina en la mucosa gástrica del humano es *H. pylori*, siendo encontrado en 30 a 100% de las gastroscopías (Stolte *et al.*, 1994), y que la prevalencia de infección por especies NHPH, aunque varía según la zona geográfica, es mucho más baja (Yang *et al.*, 1995; Mention *et al.*, 1999; Svec *et al.*, 2000; Ierardi *et al.*, 2001; Kaklikkaya *et al.*, 2002; Boyanova *et al.*, 2003). A su vez, en cuanto a la prevalencia de las distintas especies de NHPH, la de *H. suis* es más alta que la de otras especies, y en orden decreciente *H. salomonis*, *H. felis* y *H. bizzozeronii* (Van den Bulck *et al.*, 2005 a, b).

### PCR:

#### *Especies encontradas:*

El 80% de los pacientes humanos estudiados resultó positivo a *Helicobacter* spp. y también a *H. pylori*, aunque hubo 1 negativo a *Helicobacter* spp. pero positivo a *H. pylori*. Todos fueron negativos a *H. bizzozeronii*, a *H. felis*, a *H. salomonis*, a *H. heilmannii*, a *H. cynogastricus* y a *H. suis*.

Dado que la bibliografía informa la posible condición zoonótica de las especies NHPH, y teniendo en cuenta la relación estrecha que existía entre algunas de las personas estudiadas y sus perros, era esperable encontrar algún humano infectado con estas especies. Esto no sucedió así, y podría deberse quizás, como lo explican Solnick y Schauer (2001), a que estas bacterias no estén tan adaptadas al ambiente gástrico humano, ya que la infección de los seres humanos con estas bacterias es rara a pesar del contacto frecuente con los animales domésticos, así como *H. pylori* podría estar mejor adaptado a los humanos y no a los perros. Además, como las infecciones concomitantes de *H. pylori* y especies NHPH son raramente descritas, se ha sugerido que *H. pylori* podría inhibir el crecimiento de las NHPH y viceversa.

Por otra parte, debido a que las infecciones con bacterias NHPH producen signos clínicos más leves que las infecciones con *H. pylori*, probablemente las personas infectadas con NHPH no concurren a la consulta médica y por ende, estas infecciones sean subdiagnosticadas. Solamente un bajo porcentaje de pacientes humanos con gastritis severa tienen, a la observación

microscópica de biopsias gástricas, bacterias grandes, de forma espiralada, compatibles con NHPH.

Van den Bulck *et al.* (2005 a) estudiaron muestras de biopsias gástricas con presencia histológica de bacterias compatibles con especies NHPH de 123 pacientes humanos de diferentes hospitales de Bélgica y Alemania, y encontraron tasas variables de *H. felis*, *H. bizzozeronii*, *H. salomonis*, "*Candidatus Helicobacter suis*" y un fragmento desconocido de 135 pb que fue referido como HLO135. Como infecciones únicas, "*Candidatus Helicobacter suis*" fue la especie de *Helicobacter* más prevalente (30,9%), *H. salomonis*, *H. felis*, *H. bizzozeronii* y *H. pylori* se encontraron en el 11,4, en el 8,9, en el 2,4 y en el 8,9% de las muestras respectivamente y en el 7,3% HLO135. Hubo infecciones mixtas con diferentes especies, incluyendo *H. pylori* en el 16,3% de las muestras.

La alta prevalencia de bacterias NHPH en perros ha generado el interrogante acerca del rol que estos podrían tener en la transmisión al hombre. Si bien no está documentada de manera concluyente la transmisión zoonótica, existen informes que sugieren la transmisión de especies NHPH de los perros a los seres humanos y otros que sustentan el contacto de pacientes infectados con especies NHPH con mascotas.

Aunque en este trabajo no se pudo determinar significancia estadística cuando se analizó si la presencia de las bacterias en el perro influye sobre la presencia de bacterias en el humano, el valor OR da indicios de que la presencia en el perro influiría sobre la presencia en el humano. Quizás la falta de significancia estadística se pueda deber al pequeño tamaño de la muestra.

Conocer más acerca de las especies de NHPH que colonizan el estómago humano contribuiría a entender la patogénesis, epidemiología y patología de estas infecciones, por lo que sería sumamente importante que médicos patólogos y gastroenterólogos comuniquen el hallazgo de estas bacterias y se profundice su estudio a través de la aplicación de métodos de diagnóstico más específicos.

## CONCLUSIONES

En las personas con signos clínicos de gastritis crónica estudiadas la única especie encontrada fue *H. pylori*. No se encontraron especies NHPH.

En los perros las especies encontradas fueron *H. bizzozeronii*, *H. felis*, *H. salomonis* y *H. heilmannii*. No se encontró *H. cynogastricus*, *H. suis*, ni *H. pylori*.

La especie más prevalente en el perro fue *H. bizzozeronii*, seguida de *H. felis* y *H. salomonis*, y por último de *H. heilmannii* s.s.

La identidad de las especies de *Helicobacter* presentes en las muestras gástricas de humanos y de perros pudo ser determinada mediante la técnica de PCR.

Los hallazgos histopatológicos en la mucosa gástrica fueron similares en los perros infectados por las distintas especies de *Helicobacter*.

La presencia de especies de *Helicobacter* resultó independiente de la raza, sexo y edad. Tampoco hubo diferencias en las prevalencias de infección entre perros con propietarios con salidas controladas y perros de vida libre.

No se encontraron las mismas especies en personas con gastritis crónica portadoras de *Helicobacter* y en sus perros, por lo que no se puede concluir que exista transmisión humano-perro o viceversa.

## CAPÍTULO V

### BIBLIOGRAFÍA

## BIBLIOGRAFÍA

**Akamatsu T, Tabata K, Hironga M, Kawakami H, Uyeda M.** Transmission of *Helicobacter pylori* infection via flexible fiberoptic endoscopy. *Am J Infect Control* 1996;24:396-401.

**Akin OY, Tsou VM, Werner AL.** *Gastrospirillum hominis* associated chronic active gastritis. *Pediatr Pathol Lab Med* 1995;15:429-435.

**Alarcón T, Baquero M, Domingo D, López-Brea M, Royo G.** Diagnóstico microbiológico de la infección por *H. pylori*. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. SEIMC, ISBN: 84-609-392-0.

**Al-Himyary AJ, Zabaneh RI, Zabaneh SS, Barnett S.** *Gastrospirillum hominis* in acute gastric erosion. *South Med J* 1994;87:1147-1150.

**Al Sayed A, Anand PS, Kamath KP, Patil S, Preethanath RS, Anil S.** Oral cavity as an extragastric reservoir of *Helicobacter pylori*. Review article. *ISRN Gastroenterol* 2014;2014:1-16.

**Al-Soud W, Bennedsen M, On S, Ouis I, Vandamme P, Nilsson H, Ijungh A, Wadstrom T.** Assessment of PCR-DGGE for the identification of diverse *Helicobacter* species, and application to faecal samples from zoo animals to determine *Helicobacter* prevalence. *J Medic Microbiol* 2003; 52:765-771.

**Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ.** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; 215:403-410.

**Amorim I, Smet A, Alves O, Teixeira S, Saraiva AL, Taulescu M, Reis C, Haesebrouck F, Gärtner F.** Presence and significance of *Helicobacter* spp. in the gastric mucosa of portuguese dogs. *Gut Pathog* 2015;7(12):1-8.

**Anacleto TP, Lopes LR, Andreollo NA, Bernis Filho WO, Costa Resck MC, Macedo A.** Studies of distribution and recurrence of *Helicobacter* spp. gastric mucosa of dogs after triple therapy. *Acta Cir Bras* 2011;26(2):82-87.

**Andersen LP, Norgaard A, Holck S, Blom J, Elsborg L (a).** Isolation of a “*Helicobacter heilmannii*”-like organism from the human stomach. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15:95-96.

**Arfaee F, Jamshidi S, Azimirad M, Dabiri H, Tabrizi AS, Zali MR.** PCR-based diagnosis of *Helicobacter* species in the gastric and oral samples of stray dogs. *Comp Clin Pathol* 2014;23:135-139.

**Astudillo Vergara M.** Detección de *Helicobacter pylori* y organismos *Helicobacter heilmannii*-like en mucosa gástrica de perros, a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Tesis de grado, Universidad de Chile. 2009, 55 pp.

**Atherton JC (a).** The clinical relevance of strain types of *Helicobacter pylori*. *Gut* 1997;40:701-703.

**Atherton JC (b).** Non-endoscopic tests in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 1997;2(1):2-20.

**Aziz RK, Khalifa MM, Sharaf RR.** Contaminated water as a source of *Helicobacter pylori* infection: a review. *J Adv Res* 2015;6:539-547.

**Baele M, Decostere A, Vandamme P, Ceelen L, Hellemans A, Chiers K, Ducatelle R, Haesebrouck F (a).** Isolation and characterization of *Helicobacter suis* sp. nov. from pig stomachs. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008;58:1350-1358.

**Baele M, Haesebrouck F, Vandamme P, Van den Bulck K, Gruntar I, Mehle J, Mast J, Ducatelle R, Decostere A (b).** *Helicobacter baculiformis* sp. nov. isolated from feline stomach mucosa. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008;58:357-364.

**Baele M, Van Den Bulck K, Decostere A, Vandamme P, Hanninen M, Ducatelle R, Haesebrouck F.** Multiplex PCR assay for differentiation of *Helicobacter felis*, *H. bizzozeronii*, and *H. salomonis*. *J Clin Microbiol* 2004;42(3):1115-1122.

**Bellack NR, Koehoorn MW, Macnab YC, Morshed MG.** A conceptual model of water's role as a reservoir in *Helicobacter pylori* transmission: a review of the evidence. *Epidemiol Infect* 2006;134:439-449.

**Beswick EJ, Pinchuk IV, Suarez G, Sierra JC, Reyes VE.** *Helicobacter pylori* CagA-dependent macrophage migration inhibitory factor produced by gastric epithelial cells binds to CD74 and stimulates procarcinogenic events. *J Immunol* 2006;176(11):6794-6801.

**Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM, Chyou PH, Stemmermann GN, Nomura A.** Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* 1995;55:2111-2115.

**Bohmer CJ, Klinkenberg-Knol EC, Kuipers EJ, Niezen-de Boer MC, Schreuder H, Schuckink-Kool F, Meuwissen SG.** The prevalence of *Helicobacter pylori* infection among inhabitants and healthy employees of institutes for the intellectually disabled. *Am J Gastroenterol* 1997;92:1000-1004.

**Borody TJ, Brandl S, Andrews P, Jankiewicz E, Ostapowicz N.** *Helicobacter pylori*-negative gastric ulcer. *Am J Gastroenterol* 1992;87:1403-1406.

**Boyanova L, Koumanova R, Lazarova E, Jeleu C.** *Helicobacter pylori* and *Helicobacter heilmannii* in children. A bulgarian study. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003;46:249-252.

**Brenner H, Rothenbacher D, Bode G, Adler G.** Parental history of gastric or duodenal ulcer and prevalence of *Helicobacter pylori* infection in preschool children: population based study. *BMJ* 1998;316:665.

**Brenner H, Rothenbacher D, Bode G, Dieudonné P, Adlert G.** Active infection with *Helicobacter pylori* in healthy couples. *Epidemiol Infect* 1999;122:91-95.

**Bridgeford EC, Marini RP, Feng Y, Parry NMA, Rickman B, Fox JG.** Gastric *Helicobacter* species as a cause of feline gastric lymphoma: a viable hypothesis. *Vet Immunol Immunopathol* 2008;123:106-113.

**Brooks HJ, Ahmed D, McConnell MA, Barbezat GO.** Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by polymerase chain reaction: is it worth it? *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004;50:1-5.

**Buczolits S, Hirt R, Rosengarten R, Busse HJ.** PCR-based genetic evidence for occurrence of *Helicobacter pylori* and novel *Helicobacter* species in the canine gastric mucosa. *Vet Microbiol* 2003;95:259-270.

**Bickley J, Owen R, Fraser A, Pounder R.** Evaluation of the polymerase chain reaction for detecting the urease C gene of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy samples and dental plaque. *J Med Microbiol* 1993;39(5):338-344.

**Calvet X, Sánchez-Delgado J, Montserrat A, Lario S, Ramírez-Lázaro MJ, Quesada M, Casalots A, Suárez D, Campo R, Brullet E, Junquera F, Sanfeliu I, Segura F.** Accuracy of diagnostic tests for *Helicobacter pylori*: a reappraisal. Clin Infect Dis 2009;48:1385-1391.

**Cattoli G, van Vugt R, Zanoni RG, Sanguinetti V, Chiocchetti R, Gualtieri M, Vandenbroucke-Grauls CM, Gastra W, Kusters JG.** Occurrence and characterization of gastric *Helicobacter* spp. in naturally infected dogs. Vet Microbiol 1999; 70(3-4):239-50.

**Chisholm SA, Owen RJ.** Development and application of a novel screening PCR assay for direct detection of “*Helicobacter heilmannii*”- like organisms in human gastric biopsies in Southeast England. Diagn Microbiol Infect Dis 2003;46:1-7.

**Chisholm A, Teare EL, Patel B, Owen RJ.** Determination of *Helicobacter pylori vacA* allelic types by single-step multiplex PCR. Lett Appl Microbiol 2002;35:42-46.

**Clayton C, Kleanthous K, Tabaqchali S.** Detection and identification of *Helicobacter pylori* by the polymerase chain reaction. J Clin Pathol 1991;44:515-516.

**Clayton C, Kleanthous H, Coates P, Morgan D, Tabaqchali S.** Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by using polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1992;30(1):192-200.

**Corti, R.E.** *Helicobacter pylori*: algunos aspectos epidemiológicos en Latinoamérica luego de un cuarto de siglo. Acta Gastroenterol Latinoam 2009;39(3).

**Cornetta A, Simpson KW, Strauss-Ayali D, McDonough PL, Gleed RD.** Evaluation of a 13C-urea breath test for detection of gastric infection with *Helicobacter* spp. in dogs. Am J Vet Res 1998;59:1364-1369.

**Cox RA.** Methods in enzymology. Vol. 12, parte B, Academic Press, Orlando, FL; 1968. Pp 120-129.

**Crabtree JE, Covacci A, Farmery SM, Xiang Z, Tompkins DS, Perry S, Lindley IJ, Rappuoli R.** *Helicobacter pylori* induced interleukin-8 expression in gastric epithelial cells is associated with cagA positive phenotype. J Clin Pathol 1995;48:41-45.

**Cutler AF.** Testing for *Helicobacter pylori* in clinical practice. Am J Med 1996;20:100(5A),35-39.

**Day MJ, Bilzer T, Mansell J, Wilcock B, Hall EJ, Jergens A, Minami T, Willard M, Washabau R.** World Small Animal Veterinary Association Gastrointestinal Standardization Group. Histopathological standards for the diagnosis of gastrointestinal inflammation in endoscopic biopsy samples from the dog and cat: a report from the World Small Animal Veterinary Association Gastrointestinal Standardization Group. *J Comp Pathol* 2008;138(1):1-43.

**De Bock M, D’Herde K, Duchateau L, Hellemans A, Decostere A, Haesebrouck F, Ducatelle R.** The pathogenic effect of *Helicobacter felis* and *Helicobacter bizzozeronii* on the gastric mucosa in Mongolian gerbils: a sequential pathological study. *J Comp Pathol* 2006;135:226-236.

**De Bock M, Van Del Bulck K, Hellemans A, Daminet S, Coche J, Debongnie J, Decostere A, Haesebrouck F, Ducatelle R.** Peptic ulcer disease associated with *Helicobacter felis* in a dog owner. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2007;19(1):79-82.

**Debongnie JC, Donnay M, Mairesse J.** *Gastrospirillum hominis* (“*Helicobacter heilmannii*”): a cause of gastritis, sometimes transient, better diagnosed by touch cytology?. *Am J Gastroenterol* 1995;90:411-416.

**Debongnie JC, Donnay M, Mairesse J, Lamy V, Dekoninck X, Ramdani B.** Gastric ulcers and *Helicobacter heilmannii*. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1998;10:51-254.

**Debongnie JC, Mairesse J, Donnay M, Dekoninck X.** Touch cytology. A quick, simple, sensitive screening test in the diagnosis of infections of the gastrointestinal mucosa. *Arch Pathol Lab Med* 1994;118:1115-1118.

**De Bruyne E, Ducatelle R, Foss D, Sanchez M, Joosten M, Zhang G, Smet A, Pasmans F, Haesebrouck F, Flahou B.** Oral glutathione supplementation drastically reduces *Helicobacter*-induced gastric pathologies. *Sci Rep* 2016;6:201-269.

**De Groote D, Van Doorn L, Ducatelle R, Verschuuren A, Haesebrouck F, Quint W, Jalava K, Vandamme P.** *Candidatus Helicobacter suis*, a gastric helicobacter from pigs, and its phylogenetic relatedness to other gastrospirilla. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:1769-1777.

**De Groote D, Van Doorn L, Van den Bulck K, Vandamme P, Vieth M, Stolte M, Debongnie JC, Burette A, Haesebrouck F, Ducatelle R.** Detection of non-*pylori Helicobacter* species in *Helicobacter heilmannii*-infected humans. *Helicob* 2005;10(5):398-406.

**De Hert M, Hautekeete M, De Wilde D, Peuskens J.** High prevalence of *Helicobacter pylori* in institutionalized schizophrenic patients. *Schizophr Res* 1997;26:243-244.

**De Martel C, Ferlay J, Franceschi S, Vignat J, Bray F, Forman D, Plummer M.** Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol* 2012;13:607-615.

**DeNovo RC, Magne ML.** Current concepts in the management of *Helicobacter* associated gastritis. In: Proceedings 13th Annual ACVIM Veterinary Forum, Lake Buena Vista, FL, American College of Veterinary Internal Medicine. 1995.

**Dent JC, McNulty CAM, Uff JC, Wilkinson SP, Gear MWL.** Spiral organisms in the gastric antrum. *Lancet* 1987;II:96.

**De Reuse H, Labigne A, Mengin-Lecreux D.** The *Helicobacter pylori* ureC gene codes for a phosphoglucosamine mutase. *J Bacteriol* 1997;179:3488-3493.

**De Toledo Vieira F, Pereira da Silva JC, Vargas Vitoria MI, De Toledo Vieira M, Real Pereira CE.** Frequência e distribuição de *Helicobacter* spp. na mucosa gástrica de cães. *Rev Ceres Viçosa* 2012;59(1):25-31.

**Dewhirst FE, Shen Z, Scimeca MS, Stokes LN, Boumenna T, Chen T, Paster BJ, Fox JG.** Discordant 16S and 23S rRNA gene phylogenies for the genus *Helicobacter*: implications for phylogenetic inference and systematics. *J Bacteriol* 2005;187:6106-6118.

**Dieterich C, Wiesel P, Neiger R, Blum A, Corthesy-Theulaz I.** Presence of multiple “*Helicobacter heilmannii*” strains in an individual suffering from ulcers and in his two cats. *J Clin Microbiol* 1998;36:1366-1370.

**Diker KS, Hazirolu R, Akan M, Celik S, Kabakci, N.** The prevalence, colonization sites and pathological effects of gastric *Helicobacter* in dogs. *Turk J Vet Animal Sci* 2002;26:345-351.

**Dinić M, Stanković Đorđević D, Tasić G, Kocić B, Bogdanović M.** *Helicobacter pylori* infection and upper gastrointestinal disease. Review article. *Scientific Journal of the Faculty of Medicine in Niš* 2012;29(1):5-10.

**Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Gorrea P.** Classification and grading of gastritis. The updated Sydney system. *Am J Surg Pathol* 1996;20:1161-1181.

**Dore MP, Sepulveda AR, El-Zimaity H, Yamaoka Y, Osato MS, Mototsugu K, Nieddu AM, Realdi G, Graham DY.** Isolation of *Helicobacter pylori* from sheep-implications for transmission to humans. *Am J Gastroenterol* 2001;96(5):1396-1401.

**Drewitz DJ, Shub MD, Ramirez FC.** *Gastrospirillum hominis* gastritis in a child with celiac sprue. *Dig Dis Sci* 1997;42:1083-1086.

**Drumm B, Perez-Perez GI, Blaser MJ, Sherman PM.** Intrafamilial clustering of *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* 1990;322:359-363.

**Dubois A, Fiala N, Heman-Ackah LM, Drazek ES, Tarnawski A, Fishbein WN, Perez-Perez GI, Blaser MJ.** Natural gastric infection with *Helicobacter pylori* in monkeys: a model for spiral bacteria infection in humans. *Gastroenterol* 1994;106:1405-1417.

**Dye KR, Marshall BJ, Frierson HF, Guerrant RL, McCallum RW.** Ultrastructure of another spiral organism associated with human gastritis. *Dig Dis Sci* 1989;34:1787-1791.

**Eaton K, Dewhirst F, Paster B, Tzellas N, Coleman B, Paola J, Sherding R.** Prevalence and varieties of *Helicobacter* species in dogs from random sources and pet dogs: animals and public health implications. *J Clin Microbiol* 1996;34(4):3165-3170.

**Eidt S, Stolte M, Fischer R.** *Helicobacter pylori* gastritis and primary gastric non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Pathol* 1994;47:436-439.

**Ekman E, Frederiksson M, Trowald-Wigh G.** *Helicobacter* spp. in the saliva, stomach, duodenum and faeces of colony dogs. *Vet J* 2013;195:127-129.

**El-Zaatari FA, Woo J S, Badr A, Osato MS, Serna H, Lichtenberger LM, Genta RM, Graham DY.** Failure to isolate *Helicobacter pylori* from stray cats indicates that *H. pylori* in cats may be an anthroponosis- an animal infection with a human pathogen. *J Med Microbiol* 1997;46:372-376.

**Evans DJ Jr, Evans DG, Takemura T, Nakano H, Lampert HC, Graham DY, Granger DN, Kvietyts PR.** Characterization of a *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. *Infect Immun* 1995;63:2213-2220.

**Faigel DO, Furth EE, Childs M, Goin J, Metz DC.** Histological predictors of active *Helicobacter pylori* infection. *Dig Dis Sci* 1996;41:937-943.

**Fallone CA.** Determinants of ethnic or geographical differences in infectivity and transmissibility of *Helicobacter pylori*. *Can J Gastroenterol* 1999;13:251-255.

**Fenjvesi A, Naumov B, Kovac I.** *Helicobacter heilmannii* (*Gastrospirillum hominis*) as a new cause of gastritis-case report. *Medicinski pregled*; 1999;52(6-8):275-277.

**Fiedorek SC, Malaty HM, Evans DL, Pumphrey CL, Casteel HB, Evans DJ, DY Graham.** Factors influencing the epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in children. *Pediatrics* 1991;88:578-582.

**Figura N, Guglielmetti P, Quaranta S.** Spiral shaped bacteria in gastric mucosa. *J Clin Pathol* 1990;43:173.

**Fischer R, Samisch W.** *Gastrospirillum hominis*: another four cases. *Lancet* 1990;I:59.

**Fléjou JF, Diomande I, Molas G, Goldfain D, Rotenberg A, Florent M, Potet F.** Gastrite chronique associée chez l'homme à la présence de germes spirales non-*Helicobacter pylori* ("*Gastrospirillum hominis*"). *Gastroenterol Clin Biol* 1990;14:806-810.

**Foschini MP, Pieri F, Cerasoli S, Accardo P, Formica G, Biasiucci A, Donzelli C, Villanacci V.** *Helicobacter heilmannii*: studio anatomo-clinico di 14 nuovi casi. *Pathol* 1999;91:18-24.

**Fox JG, Batchelder M, Marini R, Yan L, Handt L, Li X, Shames B, Hayward A, Campbell J, Murphy JC.** *Helicobacter pylori* induced gastritis in the domestic cat. *Infect Immun* 1995;63:2674-2681.

**Geis G, Leying H, Suerbaum B, Mai UY, Opferkuch W.** Ultrastructural and chemical analysis of *Campylobacter pylori* flagella. *J Clin Microbiol* 1989;27:436-441.

**Georgopoulos SD, Mentis AF, Spiliadis CA, Tzouvelekis LS, Tzelepi E, Moshopoulos A, Skandalis N.** *Helicobacter pylori* infection in spouses of patients with duodenal ulcers and comparison of ribosomal RNA gene patterns. *Gut* 1996;39:634-638.

**Germani Y, Dauga C, Duval P, Huerre M, Levy M, Pialoux G, Sansonetti P, Grimont PAD.** Strategy for the detection of *Helicobacter* species by amplification of 16s rRNA genes and identification of *H. felis* in a human gastric biopsy. Res Microbiol 1997;148:315-326.

**Geyer C, Colbatzky F, Lechner J, Hermanns W.** Occurrence of spiral-shaped bacteria in gastric biopsies of dogs and cats. Vet Rec 1993;133:18-19.

**Goddard, AF, Logan RP, Atherton JC, Jenkins D, Spiller RC.** Healing of duodenal ulcer after eradication of *Helicobacter heilmannii*. Lancet 1997;349:1815-1816.

**Goji S, Tamura Y, Sasakia M, Nakamura M, Matsui H, Yamagata S, Masahide M, Naotaka E, Yasushi O, Kunio F, Kasugai K.** *Helicobacter suis*-infected nodular gastritis and a review of diagnostic sensitivity for *Helicobacter heilmannii*-like organisms. Case Rep Gastroenterol 2015;9:179-187.

**Gómez L, Orozco S.** *Helicobacter spp.* en un perro con vómito crónico. Reporte de un caso. Rev Col Cienc Pec 2003;16:1.

**Goodman KJ, Correa P.** Transmission of *Helicobacter pylori* among siblings. Lancet 2000; 355:358-362.

**Goodwin CS, McCulloch RK, Armstrong JA, Wee HS.** Unusual cellular fatty acids and distinctive ultrastructure in a new spiral bacterium (*Campylobacter pyloridis*) from the human gastric mucosa. J Med Microbiol 1985;19:257-268.

**Goto K, Ohashi H, Takakura A, Itoh T.** Current status of *Helicobacter* contamination of laboratory mice, rats, gerbils, and house musk shrews in Japan. Curr Microbiol 2000;41:161-166.

**Graham DY, Opekun AR, Osato MS, El-Zimaity HM, Lee CK, Yamaoka Y, Qureshi WA, Cadoz M, Monath TP.** Challenge model for *Helicobacter pylori* infection in human volunteers. Gut 2004;53:1235-1243.

**Gramley WA, Asghar A, Frierson HF, Powell SM.** Detection of *Helicobacter pylori* DNA in fecal samples from infected individuals. J Clin Microbiol 1999;37:2236-2240.

**Grübel P, Hoffman JS, Chong FK, Burstein NA, Mepani Ch, Cave DR.** Vector potential of houseflies (*Musca domestica*) for *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol 1997;35(6):1300-1303.

**Guendulain C, González G, Pelliza B, Caffaratti M, Bessone A, Tamiozzo P.** Detección de *Helicobacter bizzozeronii* y *Helicobacter felis* en biopsias gástricas de perros. Rev Cient FCV-LUZ 2016;26(5):286-292.

**Haesebrouck F, Pasmans F, Flahou B, Chiers K, Baele M, Meyns T, Decostere A, Ducatelle R.** Gastric *Helicobacters* in domestic animals and nonhuman primates and their significance for human health. Clin Microbiol Rev 2009;22(2):202-223.

**Handt LK, Fox JG, Dewhirst FE, Fraser GJ, Paster BJ, Yan LL, Rozmiarek H, Rufo R, Stalis IH.** *Helicobacter pylori* isolated from the domestic cat: public health implications. Infect Immun 1994;62:2367-2374.

**Handt LK, Fox JG, Yan LL, Shen Z, Pouch WJ, Ngai D, Motzel SL, Nolan TE, Klein HJ.** Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in a colony of rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). J Clin Microbiol 1997;35(1):165-168.

**Hänninen ML, Happonen I, Jalava K.** Transmission of canine gastric *Helicobacter salomonis* infection from dam to offspring and between puppies. Vet Microbiol 1998;62:47-58.

**Hänninen ML, Happonen I, Saari S, Jalava K.** Culture and characteristics of *Helicobacter bizzozeronii*, a new canine gastric *Helicobacter* sp. Int J Syst Bacteriol 1996;46:160-166.

**Happonen I, Linden J, Saari S, Karjalainen M, Hänninen M, Jalava K, Westermarck E.** Detection and effects of *Helicobacters* in healthy dogs and dogs with signs of gastritis. J Am Vet Med Assoc 1998;213(12):1767-1774.

**Happonen EU, Linden J, Westermarck E.** Effect of triple therapy on eradication of canine gastric helicobacters and gastric disease. J Small Anim Pract. 2008;41(1):1-6.

**Happonen I, Saari S, Castren L, Tyni O, Hänninen ML, Westermarck E.** Occurrence and topographical mapping of gastric *Helicobacter*-like organisms and their association with histological changes in apparently healthy dogs and cats. J Vet Med A 1996;43:305-315.

**Harris AW, Douds A, Meurisse EV, Dennis M, Chambers S, Gould SR.** Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in residents of a hospital for people with severe learning difficulties. Eur J Gastroenterol Hepatol 1995;7:21-3.

**Hazell SL, Lee A, Brady L, Hennessy W.** *Campylobacter pyloridis* and gastritis. Association with intercellular spaces and adaptation to an environment of mucus as important factors in colonization of the gastric epithelium. *J Infect Dis* 1986;153:658-663.

**Heilmann K, Borchard F.** Gastritis due to spiral-shaped bacteria other than *Helicobacter pylori*: clinical, histological and ultrastructural findings. *Gut* 1991;32:137-140.

**Henry GA, Long PH, Burns JL, Charbonneau DL.** Gastric spirillosis in beagles. *Am J Vet Res* 1987;48:831-836.

**Hermanns W, Kregel K, Breuer W, Lechner J.** *Helicobacter*-like organisms: histopathological examination of gastric biopsies from dogs and cats. *J Comp Pathol* 1995;112:307-318.

**Hilzenrat N, Lamoureux E, Weintrub I, Alpert E, Lichter M, Alpert L.** *Helicobacter heilmannii*-like spiral bacteria in gastric mucosal biopsies. Prevalence and clinical significance. *Arch Pathol Lab Med* 1995;119:1149-1153.

**Hirschl AM, Makristathis A.** Methods to detect *Helicobacter pylori*: from culture to molecular biology. *Helicob* 2007;12(2):6-11.

**Ho S, Hoyle J, Lewis F, Secker A, Cross D, Mapstone N, Dixon M, Wyatt J, Tompkins D, Taylor G.** Direct polymerase chain reaction test for detection of *Helicobacter pylori* in humans and animals. *J Clin Microbiol* 1991;29(11):2543-2549.

**Hong S, Chung Y, Kang W, Choi Y, Kim O.** Comparison of three diagnostic assays for the identification of *Helicobacter* spp. in laboratory dogs. *Lab Anim Res* 2015;31(2):86-92.

**Honsová E, Králová Z, Julisová I, Trnková M, Julis I, Trnka V.** *Helicobacter heilmannii*, a spiral bacterium, in gastric mucosa biopsies. *Cesk Patol* 1999;35(4):140-143.

**Hook-Nikanne J, Perez-Perez GI, Blaser MJ.** Antigenic characterization of *Helicobacter pylori* strains from different parts of the world. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997;4:592-597.

**Hwang C, Han H, Youn H.** Prevalence and clinical characterization of gastric *Helicobacter* species infection of dogs and cats in Korea. *J Vet Sci* 2002;3(2):123-133.

**Ihaka R y Gentleman R.** Software R 3.5.1, 2018. R Development Core Team. [www.r-project.org](http://www.r-project.org).

**Ierardi E, Monno RA, Gentile A, Francavilla R, Burattini O, Maran L, Francavilla A.** *Helicobacter heilmannii* gastritis: a histological and immunohistochemical trait. J Clin Pathol 2001;54:774-777.

**Ierardi E, Monno R, Mongelli A, Allegretta L, Milone E, Rizzi S, Panza P, Coppolecchia P, Francavilla A.** *Gastrospirillum hominis* associated chronic active gastritis: the first report from Italy. Ital J Gastroenterol 1991;23:86-87.

**Jalava K, Kaartinen M, Utriainen M, Happonen I, Hänninen M.** *Helicobacter salomonis* sp. nov., a canine gastric *Helicobacter* sp. related to *Helicobacter felis* and *Helicobacter bizzozeronii*. Int J Syst Bacteriol 1997;47:975-982.

**Jalava K, On S, Harrington C, Andersen L, Hanninen M, Vandamme P.** A cultured strain of *Helicobacter heilmannii* a human gastric pathogen, identified as *bizzozeronii*, evidence for zoonotic potential of *Helicobacter*. Emerg Infec Dis 2001;7:1036-1038.

**Jalava K, On S, Vandamme P, Happonen I, Sukura A, Hanninen M.** Isolation and identification de *Helicobacter spp.* from canine and feline gastric mucosa. Eukaryot Cell. Appl Environ Microbiol 1998;64(10):3998-4006.

**Jara Verdugo MS.** Determinación histológica de la presencia de bacterias curvo-espiriladas tipo *Helicobacter spp.* en estómago, intestinos, hígado y vesícula biliar de perros (*Canis familiaris*) de la ciudad de Valdivia, Chile. 2003 Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias.

**Jhala D, Jhala N, Lechago J, Haber M.** *Helicobacter heilmannii* gastritis: association with acid peptic diseases and comparison with *Helicobacter pylori* gastritis. Mod Pathol 1999;12:534-538.

**Jones DM, Curry A, Fox JA.** An ultrastructural study of the gastric *Campylobacter* like organisms (“*Campylobacter pyloridis*”). J Gen Microbiol 1985;131:2335-2341.

**Joosten M, Linden S, Rossi M, Chin A, Tay Y, Skoog E, Padra M, Peters F, Perkins T, Vandamme P, Van Nieuwerburgh F, D’Herde K, Van den Broeck W, Flahou B, Deforce D, Ducatelle R, Marshall B, Haesebrouck F, Smet A.** Divergence between the highly virulent zoonotic pathogen *Helicobacter heilmannii* and its closest relative, the low-virulence “*Helicobacter ailurogastricus*” sp. nov. Infect Immun 2015;84:293-306.

**Josenhans C, Ferrero RL, Labigne A, Suerbaum S.** Cloning and allelic exchange mutagenesis of two flagellin genes of *Helicobacter felis*. *Mol Microbiol* 1999;33:350-362.

**Kaklikkaya N, Ozgur O, Aydin F, Cobanoglu U.** *Helicobacter heilmannii* as causative agent of chronic active gastritis. *Scand J Infect Dis* 2002;34:768-770.

**Kim KM, Lee SG, Park MG, Song JY, Kang HL, Lee WK, Cho MJ, Rhee KH, Youn HS, Baik SC.** Gamma-glutamyltranspeptidase of *Helicobacter pylori* induces mitochondria-mediated apoptosis in AGS cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;355:562-567.

**Kivistö R, Linros J, Rautelin H, Hänninen ML.** 2008. Characterization of *Helicobacter bizzozeronii* cultured from human gastric mucosa. HP-53. Abstracts 8th International workshop on pathogenesis and host response in *Helicobacter* infections, Helsingör, Denmark.

**Kivistö R, Linros J, Rossi M, Rautelin H, Hänninen ML.** Characterization of multiple *Helicobacter bizzozeronii* isolates from a Finnish patient with severe dyspeptic symptoms and chronic active gastritis. *Helicobacter* 2010;15:58-66.

**Klein, B.** *Cunningham Fisiología Veterinaria*. 5ta ed. España: Ed. Elsevier Saunders; 2014. 624 p.

**Krishnamurthy P, Parlow M, Zitzer JB, Vakil NB, Mobley HL, Levy M, Phadnis SH, Dunn BE.** *Helicobacter pylori* containing only cytoplasmic urease is susceptible to acid. *Infect Immun* 1998;66:5060-5066.

**Kubota S, Ohno K, Tsukamoto A, Maeda S, Murata Y, Nakashima K, Fukushima K, Uchida K, Fujino Y, Tsujimoto H.** Value of the 13C-urea breath test for detection of gastric *Helicobacter* spp. infection in dogs undergoing endoscopic examination. *J Vet Med Sci* 2013;75:1049-1054.

**Laine L, Lewin DN, Naritoku W, Cohen H.** Prospective comparison of H&E, Giemsa, and Genta stains for the diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Gastrointest Endosc* 1997;45:463-467.

**Lambert JR, Lin SK, Sievert W, et al.** High prevalence of *Helicobacter pylori* antibodies in an institutionalized population: evidence for person-to-person transmission. *Am J Gastroenterol* 1995;90:2167-2171.

**Lavelle JP, Landas S, Mitros FA, Conklin JL.** Acute gastritis associated with spiral organisms from cats. *Dig Dis Sci* 1994;39:744-750.

**Lecoindre P, Chevallier M, Peyrol S, Boude M, Ferrero R, Labigne A.** Pathogenic role of gastric *Helicobacter* sp in domestic carnivores. *Vet Res* 1997;28(3):207-215.

**Lee A.** *Helicobacter pylori*: the unsuspected and unlikely global gastroduodenal pathogen. *Int J Infect Dis* 1996;1:47-56.

**Lee A, Hazell SL, O'Rourke J, Kouprach S.** Isolation of a spiral-shaped bacterium from the cat stomach. *Infect Immun* 1988;56:2843-2850.

**Lee A, Krakowka S, Fox JG, Otto G, Eaton KA, Murphy JC.** Role of *Helicobacter felis* in chronic canine gastritis. *Vet Pathol* 1992;29:487-494.

**Lee SG, Kim C, Ha YC.** Successful cultivation of a potentially pathogenic coccoid organism with trophism for gastric mucin. *Infect Immun* 1997;65:49-54.

**Leib MS, Duncan RB, Ward DL.** Triple antimicrobial therapy and acid suppression in dogs with chronic vomiting and gastric *Helicobacter* spp. *J Vet Intern Med* 2007;21(6):1185-1192.

**Lekunze Fritz E, Slavik T, Delpont W, Olivier B, van der Merwe SW.** Incidence of *Helicobacter felis* and the effect of coinfection with *Helicobacter pylori* on the gastric mucosa in the african population. *J Clin Microbiol* 2006;44(5):1692-1696.

**Lewindon PJ, Lau D, Chan A, Tse P, Sullivan PB.** *Helicobacter pylori* in an institution for disabled children in Hong Kong. *Dev Med Child Neurol* 1997;39:682-685.

**Li C, Musich P, Ha T, Ferguson D, Patel N, Chi D, Thomas E.** High prevalence of *Helicobacter pylori* in saliva demonstrated by a novel PCR assay. *J Clin Pathol* 1995;48:662-666.

**Liu J, He L, Haesebrouck F, Gong Y, Flahou B, Cao Q, Zhang J.** Prevalence of coinfection with gastric non- *Helicobacter pylori* *Helicobacter* (NHPH) species in *Helicobacter pylori*-infected patients suffering from gastric disease in Beijing, China. *Helicobacter* 2015;20:284-290.

**Liu C, Rossi M, Linden S, Padra M, Blaecher C, Bauwens E, Joosten M, Flahou B, Van den Broeck W, Ducatelle R, Haesebrouck F, Smet A.** The *Helicobacter heilmannii* *hofE* and *hofF* genes are essential for colonization of the gastric mucosa and play a role in IL-1beta-Induced gastric MUC13 expression. *Helicobacter* 2016;21:504-522.

**Lockard VG, Boler RK.** Ultrastructure of a spiraled microorganism in the gastric mucosa of dogs. *Am J Vet Res* 1970;31:1453-1462.

**Lottspeich C, Schwarzer A, Panthel K, Koletzko S, Russmann H.** Evaluation of the novel *H. pylori* ClariRes real-time PCR assay for detection and clarithromycin susceptibility testing of *Helicobacter pylori* in stool specimens from symptomatic children. *J Clin Microbiol* 2007;45(6):1718-1722.

**Lu J, Perng C, Shyu R, Chen C, Lou Q, Chong S, Lee C.** Comparison of five PCR methods for detection of *Helicobacter pylori* DNA in gastric tissues. *J Clin Microbiol* 1999;37(3):772-774.

**Makristathis A, Barousch W, Pasching E, Binder C, Kuderna C, Apfalter P, Rotter ML, Hirschl AM.** Two enzyme immunoassays and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens from pediatric patients before and after eradication therapy. *J Clin Microbiol* 2000;38(10):3710-3714.

**Marcus EA, Scott DR.** Cell lysis is responsible for the appearance of extracellular urease in *Helicobacter pylori*. *Helicob* 2001;6:93-99.

**Marshall BJ.** The *Campylobacter pylori* story. *Scand J Gastroenterol* 1988;23(146):58-66.

**Marshall BJ, Warren JR.** Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984;1:1311-1315.

**Mattana CM, Vega AE, Flores G, De Domenicon AG, De Centorbi OV.** Isolation of *Helicobacter pylori* from dental plaque. *Rev Arg Microbio* 1998;30:93-95.

**Mazzucchelli L, Wilder-Smith CH, Ruchti C, Meyer-Wyss B, Merki HS.** *Gastrospirillum hominis* in asymptomatic, healthy individuals. *Dig Dis Sci* 1993;38:2087-2089.

**McNulty CA, Dent JC, Curry A, Uff JS, Ford GA, Gear MW, Wilkinson SP.** New spiral bacterium in gastric mucosa. *J Clin Pathol* 1989;42:585-591.

**Meining A, Kroher G, Stolte M.** Animal reservoirs in the transmission of *Helicobacter heilmannii*. Results of a questionnaire-based study. *Scand J Gastroenterol* 1998;33:795-798.

**Méndez-Tenorio A, Larios-Serrato V, Olguín-Ruiz EG, Sánchez-Vallejo CJ, Torres-López RC, Avilés-Jiménez F, Camorlinga-Ponce M, Torres J.** Genome sequence of a *Helicobacter pylori* strain isolated from a Mexican patient with intestinal gastric cancer. *Genome Announc* 2014;2(1):1214-1213.

**Mention K, Michaud L, Guimber D, Martin De Lasalle E, Vincent P, Turck D, Gottrand F.** Characteristics and prevalence of *Helicobacter heilmannii* infection in children undergoing upper gastrointestinal endoscopy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999;29:533-539.

**Mikkonen TP, Kärenlampi RI, Hänninen ML.** Phylogenetic analysis of gastric and enterohepatic *Helicobacter* species based on partial HSP60 gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004;54(3):753-758.

**Mirzaeian S, Sarchahi AA, Shojaee Tabrizi A, Derakhshandeh A.** Eradication of gastric *Helicobacter* spp. by triple therapy in dogs. *Vet Med* 2013;58(11):582-586.

**Mitchell HM, Bohane T, Hawkes RA, Lee A.** *Helicobacter pylori* infection within families. *Int J Med Microbiol Virol Parasitol Infect Dis* 1993;280:128-136.

**Molina-Infante J, Corti R, Doweck J, McNicholl A, Gisbert J.** Avances recientes en el tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*. *Acta Gastroenterol Latinoam* 2017;47:75-85.

**Monno R, Ierardi E, Valenza MA, Campanale A, Francavilla A, Fumarola L.** *Gastrospirillum hominis* and human chronic gastritis. *New Microbiol* 1995;18:441-444.

**Monteiro L, Gras N, Vidal R, Cabrita J, Mégraud F.** Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human feces by PCR: DNA stability and removal of inhibitors. *J Microbiol Methods* 2001;45:89-94.

**Morgner A, Bayerdorffer E, Meining A, Stolte M, Kroher G.** *Helicobacter heilmannii* and gastric cancer. *Lancet* 1995;346:551-552.

**Morgner A, Lehn N, Andersen L, Thiede C, Bennedsen M, Trebesuius K, Neubauer B, Neubauer A, Stolte M, Bayerdorffer E.** *Helicobacter heilmannii*- associated primary gastric low-grade Mast Lymphoma: Complete remission after curing the infection. *Gastroenterol* 2000;118:821-828.

**Morris A, Ali MR, Thomsen L, Hollis B.** Tightly spiral shaped bacteria in the human stomach: another cause of active chronic gastritis? *Gut* 1990;31:139-143.

**Moyaert H, Pasmans F, Ducatelle R, Haesebrouck F, Baele M.** Evaluation of 16S rRNA gene-based PCR assays for genus-level identification of *Helicobacter* species. *J Clin Microbiol* 2008;46(5):1867-1869.

**Moyat M, Mack M, Bouzourene H, Velin D.** Role of inflammatory monocytes in vaccine-induced reduction of *Helicobacter felis* infection. *Infect Immun* 2015;83:4217-4228.

**Nam HW y Kim D.** Prevalence of *Helicobacter* species infection in dogs. *Korean J Vet Res* 2000;40(4):747-753.

**Namburi RB, Berteau O, Spillmann D, Rossi M.** Chondroitinase AC: a host-associated genetic feature of *Helicobacter bizzozeronii*. *Vet Microbiol.* 2016;186:21-27.

**Neiger R, Dieterich C, Burnens A, Waldvogel A, Corthesy-Theulaz I, Halter F, Lauterburg B, Schmassmann A.** Detection and prevalence of *Helicobacter* infection in pet cats. *J Clin Microbiol* 1998;36:634-637.

**Neiger R, Tschudi M, Burnens AP, Schmassmann A.** Diagnosis and identification of gastric *Helicobacter* species by PCR in dogs. *Microb Ecol Health Dis* 1999;11(4):234-240.

**NIH Consensus Conference.** *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. NIH Consensus development panel on *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *JAMA*;1994 272:65-69.

**Nurgalieva ZZ, Conner ME, Opekun AR, Zheng CQ, Elliott SN, Ernst PB, Osato M, Estes MK, Graham DY.** Bcell and T-cell immune responses to experimental *Helicobacter pylori* infection in humans. *Infect Immun* 2005;73:2999-3006.

**Nurgalieva ZZ, Opekun AR, Graham DY.** Problem of distinguishing false-positive tests from acute or transient *Helicobacter pylori* infections. *Helicobacter* 2006;11:69-74.

**O'Connor D, Lee A.** Microbial interference between gastric *Helicobacters*: Competitive exclusion of *Helicobacter felis* by “*Gastrospirillum hominis*.” *Microb Ecol Health Dis* 1991;4:202.

**Ohtani H, Hayashi H, Higami Y, Takuma K, Minami K, Minami Y, Shimokawa I.** Acute gastritis associated with invading *Helicobacter heilmannii* organisms from a previously homeless cat. Clin Gastroenterol 2008;42:216-217.

**Okubo BM, Ricci-Azevedo R, Novak Zobiole, Buccini DF, Moreno SE.** Prevalence of *Helicobacter* spp. in dogs from Campo Grande-MS. Cienc Anim Bras 2017; 18 [online] e17286 1-10.

**Oliva MM, Lazenby AJ, Perman JA.** Gastritis associated with *Gastrospirillum hominis* in children. Comparison with *Helicobacter pylori* and review of the literature. Mod Pathol 1993;6:513-515.

**O'Rourke JL, Solnick JV, Neilan BA, Seidel K, Hayter R, Hansen LM, Lee A.** Description of “*Candidatus Helicobacter heilmannii*” based on DNA sequence analysis of 16S rRNA and urease genes. Int J Syst Evol Microbiol 2004;54:2203-2211.

**Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelman JH, Orentreich N, Sibley RK.** *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. N Engl J Med 1991;325:1127-1231.

**Parsonnet J, Hansen S, Rodriguez L, Gelb AB, Warnke RA, Jellum E, Orentreich N, Vogelman JH, Friedman GD.** *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. N Engl J Med 1994;330:1267-1271.

**Paull G, Yardley JH.** Gastric and esophageal *Campylobacter pylori* in patients with Barrett's esophagus. Gastroenterology 1988;95:216-218.

**Paz Zúñiga V.** Determinación de la presencia de *Helicobacter* sp. en perros (*Canis familiaris*) de Valdivia, a través de biopsia gástrica obtenida por endoscopía. Tesis, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile. 2002.

**Peng NJ, Lai KH, Liu RS, Lee SC, Tsay DG, Lo CC, Tseng HH, Huang WK, Lo GH, Hsu PI.** Clinical significance of oral urease in diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by [13C] urea breath test. Dig Dis Sci 2001;46(8):1772-1778.

**Phadnis SH, Parlow MH, Levy M, Ilver D, Caulkins CM, Connors JB, Dunn BE.** Surface localization of *Helicobacter pylori* urease and a heat shock protein homolog requires bacterial autolysis. Infect Immun 1996;64:905-912.

**Piotrowski J, Slomiany A, Slomiany BL.** Inhibition of *Helicobacter pylori* urease activity by ebrotidine. *Biochem Mol Biol Int* 1995;37:247-253.

**Plummer M, Franceschi S, Vignat J, Forman D, de Martel C.** Global burden of gastric cancer attributable to *Helicobacter pylori*. *Int J Cancer* 2015;136:487-490.

**Priestnall S, Wiinberg B, Spohr A, Neuhaus B, Kuffer M, Wiedmann M, Simpson K.** Evaluation of *Helicobacter heilmanni* subtypes in the gastric mucosas of cats and dogs. *J Clin Microbiol* 2004;42(5):2144-2151.

**Pot RGJ, Stoof J, Nuijten PJM, de Haan LAM, Loeffen P, Kuipers EJ, van Vliet AHM, Kusters JG.** UreA2B2: a second urease system in the gastric pathogen *Helicobacter felis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007;50:273-279.

**Qin H, Tang G, Yi P, Pan X, Huang H, Chang R, Shi Z, Ashraf MA.** Diagnosis of Genus *Helicobacter* through a hemi-nested PCR assay of 16S rRNA. *Saudi Pharm J* 2016;24:265-272.

**Recordati C, Gualdi V, Tosi S, Vailati Facchini R, Pengo G, Luini M, Simpson K W, Scanziani E.** Detection of *Helicobacter* spp. DNA in the oral cavity of dogs. *Vet Microbiol* 2007;119:346-351.

**Regimbeau C, Karsenti D, Durand V, D'Alteroche L, Copie-Bergman C, Metman EH, Machet MC.** Low-grade gastric MALT lymphoma and *Helicobacter heilmannii* (*Gastrospirillum hominis*). *Gastroenterol Clin Biol* 1998;22(8-9):720-723.

**Robić M, Artuković B, Beck A, Gudan A, Svetina A, Grabarević Z.** Histopathological changes in stomachs of dogs with naturally acquired *Helicobacter* infection. *Veterinarski Arhiv* 2007;77(2),103-111.

**Samarbaf-Zadeh AR, Tajbakhsh S, Moosavian SM, Sadeghi-Zadeh M, Azmi M, Hashemi J, Masjedi-Zadeh A.** Application of fluorescent in situ hybridization (FISH) for the detection of *Helicobacter pylori*. *Med Sci Monit* 2007;12:426-430.

**Schildt J, Grimm T, Radke M, Lobeck H.** Akute oberbauchschmerzen und hämatemesis. *Monatsschr Kinderheilkd* 2000;148:900-901.

**Schmees C, Prinz C, Treptau T, Rad R, Hengst L, Volland P, Bauer S, Brenner L, Schmid RM, Gerhard M.** Inhibition of T-cell proliferation by *Helicobacter pylori* gamma-glutamyl transpeptidase. *Gastroenterol* 2007;132:1820-1833.

**Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R.** PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol* 2012;113(5):1014-1026.

**Seo WJ, Park CS, Cho YJ, Cha KW, Lee SW, Lim ST, Sung YH, Baek AR.** A case of gastric ulcer induced by *Helicobacter heilmannii*-like organism. *Korean J Gastroenterol* 2003;42:63-66.

**Shaikh S, Khaled MA, Islam A, Kurpad AV, Mahalanabis D.** Evaluation of stool antigen test for *Helicobacter pylori* infection in asymptomatic children from a developing country using 13C-urea breath test as a standard. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005;40(5):552-554.

**Simpson K, Burrows C.** Gastric *Helicobacter* species infection in dogs and cats: In practice. *J Vet Postgrad Clin Stud* 1999;8:427-435.

**Simpson K, Neiger R, DeNovo R, Sherding R.** The relationship of *Helicobacter* spp. infection to gastric disease in dogs and cats. *J Vet Intern Med* 2000;14:223-227.

**Singhal AV, Sepulveda AR.** *Helicobacter heilmannii* gastritis: a case study with review of literature. *Am J Surg Pathol* 2005;29(11):1537-1539.

**Sisson S y Grossman JD.** Anatomía de los animales domésticos. Tomo II, quinta edición. Editorial Salvat. 1982.

**Slomiany BL, Bilski J, Sarosiek J, Murty VLN, Dworkin B, Vonhorn K, Zielenski J, Slomiany A.** *Campylobacter pyloridis* degrades mucin and indermines gastric mucosal integrity. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;144:307-314.

**Smet A, Van Nieuwerburgh F, Ledesma J, Flahou B, Deforce D, Ducatelle R, Haesebrouck F.** Sequence of *Helicobacter heilmannii* sensu stricto ASB1 isolated from the gastric mucosa of a kitten with severe gastritis. *Genome Announcements* 2013;1(1):1-2.

**Smoot DT, Mobley HL, Chippendale GR, Lewison JF, Resau JH.** *Helicobacter pylori* urease activity is toxic to human gastric epithelial cells. *Infect Immun* 1990;58:1992-1994.

**Smoot DT, Resau JH, Naab T, Desbordes BC, Gilliam T, Bull Henry K, Curry SB, Nidiry J, Sewchand J, Mills-Robertson K, Frontin K, Abebe E, Dillon M, Chippendale GR, Phelps PC, Scott VF, Mobley HLT.** Adherence of *Helicobacter pylori* to cultured human gastric epithelial cells. *Infect Immun* 1993;61:350-355.

**Solnick JV, O'Rourke J, Lee A, Paster BJ, Dewhirst FE, Tompkins LS.** An uncultured gastric spiral organism is a newly identified *Helicobacter* in humans. *J Infect Dis* 1993;168:379-385.

**Solnick JV, Schauer D.** Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. *Clin Microbiol Rev* 2001;14(1):59-97.

**Stolte M, Kroher G, Meining A, Morgner A, Bayerdörffer E, Bethke B.** A comparison of *Helicobacter pylori* and *H. heilmannii* gastritis. *Scand J Gastroenterol* 1997;32:28-33.

**Stolte M, Wellens E, Bethke B, Ritter M, Eidt H.** *Helicobacter heilmannii* (formerly *Gastrospillum hominis*) gastritis: an infection transmitted by animals? *Scand J Gastroenterol* 1994;29:1061-1064.

**Strauss-Ayali D, Simpson K, Schein A, McDonough P, Jacobson R, Valentine B, Peacock J.** Serological discrimination of dogs infected with gastric *Helicobacter* spp. and uninfected dogs. *J Clin Microbiol* 1999;37(5):1280-1287.

**Suerbaum S, Dale A, Thomas JE, Darboe MK, Coward WA, Harding M, Weaver LT.** *Helicobacter pylori* infection, gastric acid secretion, and infant growth. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998;26:393-397.

**Suerbaum S, Michetti P.** *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* 2002;347:1175-1186.

**Svec A, Kordas P, Pavlis Z, Novotný J.** High prevalence of *Helicobacter heilmannii*-associated gastritis in a small, predominantly rural area: further evidence in support of a zoonosis?. *Scand J Gastroenterol* 2000;35(9):925-928.

**Sykora J, Hejda V, Varvarovska J, Stozicky F, Gottrand F, Siala K.** *Helicobacter heilmannii* related gastric ulcer in childhood. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003;36:410-413.

**Taylor DN, Parsonnet J.** Epidemiology and natural history of *H. pylori* infections. In MJ Blaser, Smith PF, Ravdin J, Greenberg H, Guerrant RL (ed.), *Infections of the gastrointestinal tract*. Raven Press, New York, N.Y. 1995.551-564.

**Thibaut, J.; Paz, V.; Paredes, E.; Ernst, S.** Determinación de la presencia de *Helicobacter* spp. en perros, mediante biopsia gástrica obtenida por endoscopia. Rev Cientif 2007;XVII(3):217-225.

**Thomas JE, Gibson GR, Darboe MK, Dale A, Weaver LT.** Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces. Lancet 1992;340:1194-1195.

**Thompson MA, Storey P, Greer R, Cleghorn GJ.** Canine human transmission of *Gastrospirillum hominis*. Lancet 1994;343:1605-1607.

**Tijjani B, Umar A.** Peptic ulcer disease and *Helicobacter pylori* infection at Kano, Nigeria. J Gastroenterol 2008;8(1)1-4.

**Ülgen S, Ergin S, Şennazli G, Bakirel U.** Detection of *Helicobacter heilmannii* type II and *Helicobacter pylori* in dogs and their role in the development of gastritis. Turk J Vet Anim Sci 2016; 40:81-88.

**Valentine J, Arthur, Mobley H, Dick J.** Detection of *Helicobacter pylori* by using the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1991;29(4):689-695.

**Vandamme P, Harrington CS, Jalava K, On SLW.** Misidentifying *helicobacters*: the *Helicobacter cinaedi* example. J Clin Microbiol 2000;38(6):2261-2266.

**Van den Bulck K, Decostere A, Baele M, Driesen A, Debongnie JC, Burette A, Stolte M, Ducatelle R, Haesebrouck F (a).** Identification of non-*Helicobacter pylori* spiral organisms in gastric samples from humans, dogs, and cats. J Clin Microbiol 2005;42:2256-2260.

**Van den Bulck K, Decostere A, Baele M, Vandamme P, Mast J, Ducatelle R, Haesebrouck F.** *Helicobacter cynogastricus* sp. nov., a *Helicobacter* species isolated from the canine gastric mucosa. Int J Syst Evol Microbiol 2006;56:1559-1564.

**Van den Bulck K, Decostere A, Gruntar I, Baele M, Krt B, Ducatelle R, Haesebrouck F (b).** In vitro antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter felis*, *H. bizzozeronii*, and *H. salomonis*. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:2997-3000.

**Van Loon S, Bart A, den Hertog EJ, Nikkels PG, Houwen RH, De Schryver JE, Oudshoorn JH.** *Helicobacter heilmannii* gastritis caused by cat to child transmission. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2003;36:407-409.

**Weber AF, Hasa O, Sautter JH.** Some observations concerning the presence of spirilla in the fundic glands of dogs and cats. *Am J Vet Res* 1958;19:677-680.

**Wegmann W, Aschwanden M, Schaub N, Aenishänslin W, Gyr K.** Gastritis associated with *Gastrospirillum hominis*-a zoonosis? *Schweiz Med Wochenschr* 1991;121:245-254.

**WGO/WEO Global Guideline Endoscope disinfection. World Gastroenterology Organization-World Endoscopy Organization.**

Disponible en: <http://www.worldgastroenterology.org/UsersFiles/file/guidelines/endoscope-desinfection-spanish-2011.pdf>.

**Wiinberg B, Spohr A, Dietz HH, Egelund T, Greiter-Wilke A, McDonough SP, Olsen J, Priestnall S, Chang YF, Simpson KW.** Quantitative analysis of inflammatory and immune responses in dogs with gastritis and their relationship to *Helicobacter* spp. infection. *J Vet Intern Med* 2005;19:4-14.

**Wüppenhorst N, Von Loewenich F, Hobmaier B, Vetter-Knoll M, Mohadjer S, Kist M.** Culture of a gastric non-*Helicobacter pylori Helicobacter* from the stomach of a 14-year-old girl. *Helicob.* 2012;18(1):1-5.

**Yakoob J, Abbas Z, Khan R, Naz S, Ahmad Z, Islam M, Awan S, Jafri F, Jafri W.** Prevalence of non *Helicobacter pylori* species in patients presenting with dyspepsia. *BMC Gastroenterol* 2012;12:3.

**Yali Z, Yamada N, Wen M, Matsuhisa T, Miki M.** *Gastrospirillum hominis* and *Helicobacter pylori* infection in Thai individuals: comparison of histopathological changes of gastric mucosa. *Pathol Int* 1998;48(7):507-511.

**Yamasaki K, Suematsu H, Takahashi T.** Comparison of gastric lesions in dogs and cats with and without gastric spiral organisms. *J Am Vet Med Assoc* 1998;212:529-533.

**Yamazaki S, Kato S, Matsukura N, Ohtani M, Ito Y, Suto H, Yamazaki Y, Yamakawa A, Tokudome S, Higashi H, Hatakeyama M, Azuma T.** Identification of *Helicobacter pylori* and the cagA genotype in gastric biopsies using highly sensitive real-time PCR as a new diagnostic tool. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005;44(3):261-268.

**Yang H, Dixon MF, Li X, Xu Z, Zhou D, Blum AL (a).** Acute gastritis associated with infection of large spiral-shaped bacteria. *Am J Gastroenterol* 1995;90:307-309.

**Yang H, Goliger JA, Song M, Zhou D.** High prevalence of *Helicobacter heilmannii* infection in China. *Dig Dis Sci* 1998;43:1493.

**Yang H, Li X, Xu Z, Zhou D (b).** “*Helicobacter heilmannii*” infection in a patient with gastric cancer. *Dig Dis Sci* 1995;40:1013-1014.

**Yoshimura M, Isomoto H, Shikuwa S, Osabe M, Matsunaga K, Omagari K, Mizuta Y, Murase K, Murata I, Kohno S.** A case of acute gastric mucosal lesions associated with *Helicobacter heilmannii* infection. *Helicobacter* 2002;7:322-326.

**Zhang G, Ducatelle R, De Bruyne E, Joosten M, Bosschem I, Smet A, Haesebrouck F, Flahou B.** Role of  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase in the pathogenesis of *Helicobacter suis* and *Helicobacter pylori* infections. *Vet Res* 2015;46(31):1-14.

## ANEXOS

**Anexo 1: Tablas**

**Tabla 1:** Resultados de las histopatologías, improntas y PCR de la mucosa gástrica de los perros de la primera etapa.

PERRO	BIOPSIA GÁSTRICA		
	Histopatología (H/E)	Impronta	PCR ( <i>H. spp</i> )
1-HUSKY	Moderada	Presencia	Positivo
2-KIKA	Moderada	Presencia	N
3-PETISO	Escasa	Presencia	N
4-PARVO	Abundante	Ausencia	Positivo
5-PICACHA	Moderada	Presencia	N
6-LUNA	Escasa	Presencia	N
7-TRICOLOR	Abundante	Presencia	N
8-PIT	Moderada	Presencia	N
9-NEGRI	Abundante	Presencia	Positivo
10-BARBITA	Abundante	Presencia	N
11-MARGARITA	Moderada	Presencia	Positivo
12-SUSI	Escasa	Presencia	N
13-JASPEADO	Abundante	Presencia	Positivo
14-GINA	Moderada	Presencia	Positivo
15-CAMILO	Moderada	Presencia	Positivo
16-MORENA	Abundante	Presencia	N
17-BEAGLE	Moderada	Presencia	Positivo
18-RONALD	Escasa	Presencia	N
19-HEIDI	Moderada	Presencia	Positivo
20-TITA	Escasa	Presencia	N
21-DANTE	Abundante	Presencia	N
22-CHACAL	Moderada	Presencia	Positivo
23-NAHUEL	Abundante	Presencia	N

**Tabla 2:** Resultados de las histopatologías, improntas y PCR de la mucosa gástrica de los perros de la segunda etapa.

PERRO	BIOPSIA GÁSTRICA		
	Histopatología (H/E)	Impronta	PCR ( <i>H. spp</i> )
1-NIETZCHE	Abundante	Presencia	Positivo
2-SAMUEL	Abundante	Presencia	Positivo
3-CONDOR	Moderada	Presencia	Positivo
4-LUA	Moderada	Presencia	Positivo
5-CORTITO	Abundante	Presencia	Positivo
6-TERRY	Abundante	Presencia	Positivo
7-LEO	Abundante	Presencia	Positivo
8-ROCO	Abundante	Presencia	Positivo
9-PAMPITA	Escasa	Presencia	N
10-CHOLA	Escasa	Presencia	Positivo
11-TOMAS	Moderada	Presencia	Positivo
12-FIONA	Escasa	Presencia	N
13-ROQUI	Abundante	Presencia	Positivo
14-LAIKA	Moderada	Presencia	Positivo
15-MAILI	Escasa	Presencia	Positivo
16-HORACIO	Escasa	Ausencia	N
17-SIMBA	Abundante	Presencia	Positivo
18-FRODO	Moderada	Presencia	Positivo
19-CHIQUITO	Escasa	Presencia	Positivo
20-MARA	Moderada	Presencia	Positivo
21-SASHA	Abundante	Presencia	Positivo
22-OTTO	Abundante	Presencia	N
23-LOLA	Abundante	Ausencia	N
24-NEVO	Abundante	Presencia	N
25-OSITO	Abundante	Presencia	Positivo
26-LAIZA	Abundante	Presencia	Positivo
27-ENZO	Escasa	Ausencia	N
28-COCO	Abundante	Presencia	Positivo
29-PINTA	Abundante	Presencia	Positivo
30-CHARO	Moderada	Presencia	Positivo

**Tabla 3:** Especies de *Helicobacter* en muestras gástricas de los humanos.

HUMANO	<i>H.</i> spp.	<i>H.</i> <i>pylori</i>	<i>H.</i> <i>bizzozeronii</i>	<i>H.</i> <i>felis</i>	<i>H.</i> <i>salomonis</i>	<i>H.</i> <i>heilmannii</i>	<i>H.</i> <i>cynogastricus</i>	<i>H.</i> <i>suis</i>	UreAB
1	Positivo	Positivo	N	N	N	N	N	N	N
2	Positivo	Positivo	N	N	N	N	N	N	( <i>H.</i> <i>pylori</i> )
3	Positivo	Positivo	N	N	N	N	N	N	
4	Positivo	Positivo	N	N	N	N	N	N	( <i>H.</i> <i>pylori</i> )
5	Positivo	Positivo	N	N	N	N	N	N	
6	Positivo	Positivo	N	N	N	N	N	N	
7	Positivo	Positivo	N	N	N	N	N	N	
8	Positivo	Positivo	N	N	N	N	N	N	
9	Positivo	Positivo	N	N	N	N	N	N	( <i>H.</i> <i>pylori</i> )
10	Positivo	Positivo	N	N	N	N	N	N	
11	Positivo	Positivo	N	N	N	N	N	N	
12	N	N	N	N	N	N	N	N	N
13	N	Positivo	N	N	N	N	N	N	N
14	Positivo	Positivo	N	N	N	N	N	N	
15	Positivo	Positivo	N	N	N	N	N	N	
16	N	N	N	N	N	N	N	N	
17	Positivo	Positivo	N	N	N	N	N	N	
18	Positivo	Positivo		N	N	N	N	N	
19	N	N	N	N	N	N	N	N	N
20	Positivo	Positivo	N	N	N	N	N	N	
21	Positivo	Positivo	N	N	N	N	N	N	
22	Positivo	Positivo	N	N	N	N	N	N	( <i>H.</i> <i>pylori</i> )
23	Positivo	Positivo	N	N	N	N	N	N	
24	N	N	N	N	N	N	N	N	N
25	Positivo	Positivo	N	N	N	N	N	N	N
26	N	N	N	N	N	N	N	N	N
27	Positivo	Positivo	N	N	N	N	N	N	
28	Positivo	Positivo	N	N	N	N	N	N	
29	Positivo	Positivo	N	N	N	N	N	N	
30	Positivo	Positivo	N	N	N	N	N	N	

**Tabla 4:** Especies de *Helicobacter* en muestras gástricas de los perros de la segunda etapa.

PERRO	<i>H.</i> spp.	<i>H.</i> <i>pylori</i>	<i>H.</i> <i>bizzozeronii</i>	<i>H.</i> <i>felis</i>	<i>H.</i> <i>salomonis</i>	<i>H.</i> <i>heilmannii</i>	<i>H.</i> <i>cynogastricus</i>	<i>H.</i> <i>suis</i>	UreAB
1	Positivo	N	Positivo	N	N	N	N	N	
2	Positivo	N	Positivo	N	N	N	N	N	( <i>H.</i> <i>salom.</i> )
3	Positivo	N	Positivo	N	N	N	N	N	+
4	Positivo	N	N	N	N	N	N	N	( <i>H.</i> <i>felis</i> )
5	Positivo	N	N	N	Positivo	N	N	N	( <i>H.</i> <i>salom.</i> )
6	Positivo	N	N	N	N	N	N	N	N
7	Positivo	N	N	N	N	N	N	N	N
8	Positivo	N	N	N	N	N	N	N	N
9	N	N	N	N	N	N	N	N	N
10	Positivo	N	Positivo	N	N	N	N	N	
11	Positivo	N	N	N	N	N	N	N	N
12	N	N	N	N	N	N	N	N	N
13	Positivo	N	N	N	N	N	N	N	+
14	Positivo	N	Positivo	N	N	N	N	N	
15	Positivo	N	N	N	N	N	N	N	+
16	N	N	N	N	N	N	N	N	N
17	Positivo	N	N	N	N	N	N	N	N
18	Positivo	N	N	N	N	N	N	N	( <i>H.</i> <i>heilm.</i> )
19	Positivo	N	Positivo	N	N	N	N	N	
20	Positivo	N	N	N	N	N	N	N	N
21	Positivo	N	N	N	N	N	N	N	
22	N	N	N	Positivo	N	N	N	N	
23	N	N	N	N	N	N	N	N	
24	N	N	N	N	N	N	N	N	
25	Positivo	N	Positivo	N	N	N	N	N	N
26	Positivo	N	N	N	N	N	N	N	+
27	N	N	N	N	N	N	N	N	
28	Positivo	N	N	N	N	N	N	N	
29	Positivo	N	N	N	N	N	N	N	
30	Positivo	N	N	N	N	N	N	N	

**Tabla 5:** Especies de *Helicobacter* en biopsias gástricas de los perros y de sus propietarios

	PCR BIOPSIAS GÁSTRICAS PERROS								PCR BIOPSIAS GÁSTRICAS HUMANOS							
	<i>H. spp.</i>	<i>Hp</i>	<i>Hb</i>	<i>Hf</i>	<i>Hs</i>	<i>Hh</i>	<i>Hc</i>	<i>Hsu</i>	<i>H. spp.</i>	<i>Hp</i>	<i>Hb</i>	<i>Hf</i>	<i>Hs</i>	<i>Hh</i>	<i>Hc</i>	<i>Hsu</i>
1	P	N	P	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N
2	P	N	P	N	P	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N
3	P	N	P	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N
4	P	N	N	P	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N
5	P	N	N	N	P	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N
6	P	N	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N
7	P	N	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N
8	P	N	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N
9	N	N	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N
10	P	N	P	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N
11	P	N	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N
12	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
13	P	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N
14	P	N	P	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N
15	P	N	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N
16	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
17	P	N	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N
18	P	N	N	N	N	P	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N
19	P	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
20	P	N	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N

21	P	N	N	N	N	N	N	N		P	P	N	N	N	N	N	N
22	N	N	N	P	N	N	N	N		P	P	N	N	N	N	N	N
23	N	N	N	N	N	N	N	N		P	P	N	N	N	N	N	N
24	N	N	N	N	N	N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N
25	P	N	P	N	N	N	N	N		P	P	N	N	N	N	N	N
26	P	N	N	N	N	N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N
27	N	N	N	N	N	N	N	N		P	P	N	N	N	N	N	N
28	P	N	N	N	N	N	N	N		P	P	N	N	N	N	N	N
29	P	N	N	N	N	N	N	N		P	P	N	N	N	N	N	N
30	P	N	N	N	N	N	N	N		P	P	N	N	N	N	N	N

*H. pylori (Hp)*

*H. bizzozeronii (Hb)*

*H. felis (Hf)*

*H. salomonis (Hs)*

*H. heilmannii (Hh)*

*H. cynogastricus (Hc)*

*H. suis (Hsu)*

**Tabla 6:** Signos clínicos y hallazgos histopatológicos de los perros de la segunda etapa.

Perros	Signos clínicos	Cantidad de bacterias	HALLAZGOS HISTOPATOLÓGICOS						
			Epitelio	Infiltración linfocitaria	Infiltración de células plasmáticas	Proliferación de tejido conectivo	Hiperemia	Edema	Hemorragia
1	No	Abundante	Normal	Moderada	Leve	Marcada	No	No	No
2	No	Abundante	Normal	Moderada	Moderada	Marcada	No	No	No
3	No	Moderada	Normal	Marcada	Marcada	Moderada	Marcada	No	No
4	Si	Moderada	Normal	Marcada	Marcada	Marcada	Marcada	Si	No
5	No	Abundante	Normal	Moderada	Leve	Moderada	Marcada	No	No
6	No	Abundante	Normal	Leve	Ausente	Ausente	Leve	Si	No
7	No	Abundante	Normal	Marcada	Marcada	Moderada	Leve	No	No
8	Si	Abundante	Normal	Marcada	Moderada	Leve	Leve	No	No
9	No	Escasa	Normal	Moderada	Moderada	Moderada	Marcada	No	Si
10	No	Escasa	Normal	Marcada	Leve	Marcada	No	No	No
11	Si	Moderada	Normal	Marcada	Moderada	Marcada	Moderada	No	No
12	Si	Escasa	Normal	Leve	Ausente	Leve	No	No	No
13	No	Abundante	Normal	Moderada	Moderada	Leve	Marcada	No	No
14	No	Moderada	Normal	Moderada	Leve	Moderada	Leve	No	No
15	No	Escasa	Normal	Moderada	Marcada	Moderada	Marcada	Si	No
16	No	Escasa	Normal	Moderada	Moderada	Moderada	Marcada	No	Si
17	No	Abundante	Anormal	Marcada	Marcada	Marcada atrofia glandular	Marcada	Si	Si

<b>18</b>	No	Moderada	Normal	Moderada	Moderada	Leve	No	Si	No
<b>19</b>	No	Escasa	Normal	Moderada	Ausente	Moderada	Leve	Si	No
<b>20</b>	No	Moderada	Normal	Moderada	Leve	Leve	No	Si	No
<b>21</b>	Si	Abundante	Normal	Marcada	Marcada	Marcada	Leve	No	No
<b>22</b>	No	Abundante	Normal	Moderada	Marcada	Marcada	Leve	No	No
<b>23</b>	No	Abundante	Normal	Marcada	Moderada	Moderada	Leve	Si	Si
<b>24</b>	No	Abundante	Normal	Leve	Leve	Leve	Moderada	No	No
<b>25</b>	No	Abundante	Normal	Moderada	Moderada	Moderada	Marcada	Si	Si
<b>26</b>	No	Abundante	Normal	Marcada	Moderada	Moderada	No	No	No
<b>27</b>	No	Escasa	Normal	Marcada	Moderada	Marcada	Leve	No	No
<b>28</b>	No	Abundante	Normal	Leve	Leve	Leve	Leve	No	No
<b>29</b>	No	Abundante	Normal	Marcada	Leve	Marcada	Leve	No	Si
<b>30</b>	No	Moderada	Normal	Marcada	Leve	Marcada	Leve	Si	No

**Anexo 2: Consentimiento informado del paciente**

**CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE**

Yo, ..... doy mi consentimiento para que se disponga de las muestras y de los resultados de mis exámenes médicos y los de mis mascotas para que sean utilizados exclusivamente en la investigación de la que se me ha informado, sin posibilidad de compartir o ceder éstas, en todo o en parte, a ningún otro investigador, grupo o centro distinto del responsable de esta investigación o para cualquier otro fin.

He leído y comprendido la información sobre la investigación y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos.

Por ello, firmo este consentimiento informado de forma voluntaria para manifestar mi deseo de participar en este estudio de investigación “**Detección de especies de *Helicobacter* en perros y humanos**” hasta que decida lo contrario. Al firmar este consentimiento no renuncio a ninguno de mis derechos. Recibiré una copia de este consentimiento para conservarlo y poder consultarlo en el futuro.

Nombre del paciente colaborador: .....  
DNI: .....

Firma:

Nombre del investigador: .....  
DNI: .....

Firma:

He explicado al Sr/a \_\_\_\_\_ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación y la de su mascota y he contestado a sus preguntas. Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Firma del investigador:

Fecha:

**Anexo 3: Consentimiento informado del propietario del perro**

**CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Por la presente doy mi consentimiento para que se disponga de las muestras y de los resultados de los exámenes médicos de mi perro para que sean utilizados exclusivamente en la investigación de la que se me ha informado, sin posibilidad de compartir o ceder éstas, en todo o en parte, a ningún otro investigador, grupo o centro distinto del responsable de esta investigación o para cualquier otro fin.

He sido informado sobre la investigación y entiendo que los datos obtenidos en la misma pueden ser publicados o difundidos con fines científicos.

Por ello, firmo este consentimiento informado de forma voluntaria para manifestar mi autorización para que mi mascota participe en este estudio de investigación “**Detección de especies de *Helicobacter* en humanos y perros**”.

Nombre y Apellido: .....

DNI: .....

Firma:

Nombre del investigador: .....

DNI: .....

Firma:

#### Anexo 4: Comité de ética

### COMITÉ DE ASESORAMIENTO ÉTICO DE INVESTIGACIÓN EN ANIMALES (CAE) UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO

#### COMITÉ DE ÉTICA

##### Formulario para uso de animales de laboratorio

Cuando las Investigaciones incluyen el uso de animales de laboratorio vertebrados, se deberá adicionar a la documentación general solicitada para la presentación de protocolos el siguiente formulario debidamente completado.-

#### SECCIÓN 1

Investigador principal: Méd. Vet. GUENDULAIN, Corina (Doctorando).

En el marco del Programa de Investigación “Medicina y cirugía experimental en modelos animales”, dirigido por el MV Aníbal Bessone.

Co-investigadores: Dra. M.V. Griselda González, Médico cirujano Claudio Moscone, Médico cirujano Marcos Olivero, Médico cirujano Marcos Miguel, Médica cirujana Carolina Balducci.

Equipo Técnico y Auxiliares: M.V. Marina Caffaratti, M.V. Pablo González.

**Título del protocolo:** “Detección de algunas especies de *Helicobacter* en perros y humanos”.

Fuente de Financiamiento: SeCyT-UNRC.

I. **CATEGORÍA DE INVESTIGACIÓN** (marcar con una cruz el casillero que corresponda)

- a.  No envuelve dolor o potencialmente envuelve ligero dolor o sufrimiento momentáneo\*.
- b.  Potencialmente envuelve dolor menor o sufrimiento, de corta duración que serán tratados con anestésicos/analgésicos o tranquilizantes apropiados.
- c.  Involucra mantenimiento crónico de animales con enfermedad, incomodidad y/o procedimientos con potencialidad de producir dolor o sufrimiento moderados, que serán tratados con anestésicos/analgésicos o tranquilizantes apropiados.
- d.  Potencialmente, involucra dolor o sufrimiento mayor que el de una inyección rutinaria que no puede/no será aliviado, por anestésicos /analgésicos /tranquilizantes apropiados.

II. **CARACTERÍSTICAS DE LOS ANIMALES**

Especies: caninos

Sexo: machos y hembras

Edad/Peso: entre 1 y 20 años y entre 2 y 40 kg

Proveedores: personas con diagnóstico de gastritis crónica positivas a *H.* y que son propietarias de perros.

Total de animales a ser utilizados: 30

### III. MATERIALES O PROCEDIMIENTOS PELIGROSOS

(Radioisótopos, agentes infecciosos, carcinógenos, tóxicos)

Describir los procedimientos

\*) Ligeramente dolor momentáneo se define como no mayor que el nivel y duración del dolor de una inyección de rutina

## SECCIÓN 2

I. Propósito del estudio: Determinar si las personas con signos de gastritis crónica *H.* positivas que poseen perros como mascotas, comparten las mismas especies de *H.*

II. Valor potencial del estudio: Una aproximación a la realidad en lo que respecta a las especies de *H.* en la mucosa gástrica de los perros de nuestro medio y su correlación con las halladas en el hombre, podría contribuir a esclarecer las dudas existentes en cuanto al potencial zoonótico que éstas representan, y por lo tanto, a la profilaxis y al tratamiento de la patología gástrica humana. Podría además, tener alguna implicancia en la aplicación de nuevas metodologías diagnósticas menos invasivas que las actuales.

III. Alternativas al uso de animales propuesto (se entiende por alternativas aquellas técnicas ó estrategias experimentales que cumplan con el principio de las 3R's: Reemplazo, Refinamiento y Reducción. Detallar especialmente las alternativas a procedimientos que puedan causar dolor, malestar, angustia o daños prolongados): No existen alternativas a la inclusión de perros en este trabajo, debido a que se pretende estudiar la implicancia que puede tener el contacto entre ellos y las personas, por lo cual es necesario que se cumpla esa condición de convivencia y trabajar con esos individuos específicamente.

IV. Justificación de la especie y de la utilización de animales (si corresponde): El perro posee en su estómago varias especies de *H.*, algunas de las cuales también han sido encontradas en el estómago de los humanos, por lo cual se presume que el perro podría tener alguna participación en la transmisión.

V. Procedimientos a utilizar con detalles del diseño y la metodología experimental incluyendo las variables a controlar y el análisis estadístico a aplicar: A los perros se les tomarán muestras de saliva, de materia fecal y se les realizará endoscopia gástrica. Se les realizará anestesia general

con el siguiente protocolo: nalbufina (1mg/kg) + acepromacina (0,05 mg/kg) y atropina (0,03 mg/kg) IM como premedicación, propofol (5 mg/kg) IV a efecto para la inducción e intubación y goteo de propofol para el mantenimiento.

Para la **gastroscopía** el paciente se colocará en decúbito lateral izquierdo. Se utilizará un videoendoscopio con un tubo de inserción de 1,4 m de largo, 9,8 mm de diámetro y canal de biopsia de 2,8 mm. El equipo se introducirá por la boca hasta llegar al estómago y mediante el pasaje de una pinza de biopsia por el canal de trabajo del endoscopio, se tomarán muestras de la mucosa gástrica de las distintas zonas del estómago. El endoscopio y la pinza de biopsia serán lavados con un detergente adecuado y desinfectados con glutaraldehído entre la toma de una muestra y otra.

VI. Justificación del número de animales (criterio estadístico utilizado): Se realizará un estudio de tipo experimental donde las variables en estudio no tienen alta frecuencia de presentación, por lo cual el n debe permitir hallarlas.

VII. Restricción al movimiento con descripción, justificación, duración y habituación y/o entrenamiento. El procedimiento de gastroscopía tiene una duración aproximada de 15-20 minutos (contabilizando el tiempo de preparación del animal, anestesia, la endoscopia y la toma de muestra). Posteriormente el paciente queda bajo vigilancia unos minutos hasta la recuperación de la conciencia.

VIII. Control del dolor y sufrimiento durante el procedimiento (describir y justificar analgésicos, ansiolíticos y anestésicos): Se realizará anestesia general con el siguiente protocolo: nalbufina (1mg/kg) + acepromacina (0,05 mg/kg) y atropina (0,03 mg/kg) IM como premedicación, propofol (5 mg/kg) IV a efecto para la inducción e intubación y goteo de propofol para el mantenimiento. La nalbufina es una droga analgésica opioide, efectiva para inhibir el dolor de origen visceral, de leve a moderado. Tiene un periodo de acción de 6-8 horas, por lo cual garantiza una recuperación postoperatoria confortable y sin dolor. La acepromacina es un tranquilizante mayor, que combinado con la nalbufina produce una acción neuroleptoanalgésica, potenciando los efectos sedantes de la misma. El propofol es un anestésico hipnótico cuyos efectos se logran en escasos segundos y brinda una recuperación rápida y segura, ideal para procedimientos de corta duración.

IX. Estimación del potencial dolor post-quirúrgico e intervenciones a realizar en relación al mismo: Se sugerirá al propietario que con posterioridad al procedimiento (en su domicilio) controle algunas variables indicadoras de dolor tales como: falta de apetito, decaimiento, salivación,

dilatación de pupilas, jadeo, vómitos, etc. Ante esta eventualidad deberá comunicarse con el equipo de trabajo para que evalúe la situación.

X. Cuidados postprocedimientos (incluyendo los monitoreos, criterios para establecer dolor o sufrimiento, analgésicos, antibióticos, etc.): Se colocará un antiácido inyectable (ranitidina) y el propietario le administrará un protector de la mucosa gástrica (sucralfato).

XI. Eutanasia y disposición de animales (describir métodos, criterios, criterios para eutanasia anticipada y destino final de los animales): Ninguno de los animales será sometido a eutanasia.

XII. Cualificación(es)/experiencia del investigador(es) para cada individuo mencionado en la Sección 1 (describir responsabilidades de cada persona y familiaridad con las características comportamentales fisiológicas y anatómicas de las especies a utilizar, y experiencia relevante con los procedimientos específicos. Médicos cirujanos: gastroenterólogos que realizan los estudios endoscópicos en los pacientes humanos. M.V. Corina Guendulain: realización de las endoscopías en los perros. Dra. M.V. Griselda González: toma de biopsias gástricas de perros. M.V. Pablo González: anestesista. M.V. Marina Caffaratti: asistente en la técnica endoscópica. M.V. Anibal Bessone: coordinador.

XIII. Datos del Centro responsable por el mantenimiento de los animales (detallar barreras sanitarias y sistemas de calidad empleados): Los procedimientos serán realizados en las instalaciones del Hospital de Clínica Animal de la FAV-UNRC y una vez concluidos los procedimientos de muestreo regresará a su domicilio con su propietario.

XIV. Comentarios del investigador: La toma de muestra gástrica es un procedimiento médico invasivo pero sencillo que se practica en pacientes humanos y animales con signos de gastritis. Este procedimiento sólo implica la molestia de la introducción del endoscopio por la orofaringe, pero no conlleva dolor o el mismo es mínimo. En animales se realiza bajo anestesia general, con lo cual el paciente sólo padece el stress y el dolor de la colocación de una inyección IM y de un catéter intravenoso. Luego de la gastroscopía el paciente regresa a su domicilio.

XV. Referencias (opcional).

XVI Compromiso del Investigador Principal: Declaro que toda la información anterior es exacta, de acuerdo a mi mejor conocimiento y que conozco y seguiré los principios directrices Internacionales para la Investigación Biomédica, CIOMS, Ginebra 1985. (Adjuntos)

El CAE tomará en cuenta como marco normativo de referencia:

- Directrices Internacionales para la Investigación Biomédica, CIOMS, Ginebra 1985. (Adjuntos).
- Las legislaciones nacional, provincial y municipal sobre estos temas de bioética animal.
- Códigos de ética reconocidos internacionalmente. Principio de las 3R's: Reemplazo, Refinamiento y Reducción.
- El Estatuto de las Carreras del Investigador Científico y Tecnológico y del Personal de Apoyo a la Investigación y el Desarrollo. Otras normas del CONICET.
- Documentos producidos por el CECTE.

Firma:.....

Fecha:.....

XVII Compromiso del Director del Centro responsable del mantenimiento de los animales.

Firma:.....

Fecha:.....

**INFORME COMITÉ DE EVALUACIÓN ÉTICA DE LA UNRC**

**Resultado Evaluación**

Aprobado

Aprobado con recomendación

Solicitud de enmienda

Rechazado

Firma Autoridad/ Responsable

Firma Autoridad/ Responsable

Firma Autoridad/ Responsable

Fecha

**Anexo 5: Ficha de pacientes humanos**

Nombre del paciente:		Historia Clínica:
Sexo:	Edad:	Fecha:
Dirección:		Teléfono:
Profesional actuante:		Institución:
<p><b>Motivo de consulta (signos clínicos):</b></p> <p>Dolor gástrico: <span style="float: right;">Anorexia:</span> Vómitos: alimentarios/biliosos <span style="float: right;">Hematemesis:</span> Náuseas: <span style="float: right;">Regurgitación:</span> Disfagia: <span style="float: right;">Sensación de plenitud:</span> Diarrea: <span style="float: right;">Disminución de peso:</span> (Evolución de cada uno)</p> <p>Perros en la casa:</p> <p>Cantidad:</p> <p>Viven:    dentro de la casa <input type="checkbox"/>            en el patio <input type="checkbox"/>            ambos <input type="checkbox"/></p> <p>Duermen: dentro de la casa <input type="checkbox"/>            en el patio <input type="checkbox"/>            ambos <input type="checkbox"/>            cama propietario <input type="checkbox"/></p> <p>Contacto estrecho:    si <input type="checkbox"/>            no <input type="checkbox"/></p> <p>Presentan signo <input type="checkbox"/> digestivos?: si. <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/></p>		

**Anexo 6: Ficha de perros**

Fecha	PACIENTE	Reseña	Propietario	Ficha patología	Ficha clínica	Signos clínicos	Signos endoscópicos

## Anexo 7: Producción

### PUBLICACIONES

**Histopatología versus impronta de mucosa gástrica para la detección de *Helicobacter* spp. en perros.**

**Guendulain C,** González G, Caffaratti M, González P, Babini S, Bessone A, Martínez V.

Revisión Médica Pequeñas Especies, ISSN 2007-3933. Revista electrónica, Vol. 10, 44-60, México, 2012.

**Detección de *Helicobacter* spp. en biopsias gástricas, saliva y materia fecal de perros.**

**Guendulain C,** González G, Babini S, Caffaratti M, González P, Bessone A, Tamiozzo P, Bagnis G.

Revisión Médica Pequeñas Especies, ISSN 2007-3933. Revista electrónica, Vol. 13, 36-48, México, 2013.

**Detección de *Helicobacter bizzozeronii* y *Helicobacter felis* en biopsias gástricas de perros.**

**Guendulain, C.;** González, G.; Pelliza, B.; Caffaratti, M.; Bessone, A.; Tamiozzo, P.

Revista Científica de la Universidad del Zulia, Venezuela. ISSN 0798-2259. Vol. 26 (5), pp. 286-292, 2016.

***Helicobacter* gástricos en perros y gatos y su significancia en la salud humana.**

**Guendulain, C.;** Sibilla, ML.

Revista Científica FAV-UNRC *Ab Intus*, ISSN 2618-2734, 2 (1): 93-100.

### PRESENTACIONES EN REUNIONES CIENTÍFICAS

**Presentación en poster: “Diagnóstico de *Helicobacter* en caninos. Resultados preliminares”.**

**Guendulain C.;** González G.; Caffaratti M.; Bessone A.; Bagnis, G.; Otegui, F.

**II Jornadas de Clínica de Pequeños Animales,** FAV, UNRC. Res. CD N° 209/10. Septiembre 2010.

**Presentación en poster: “Detección de *Helicobacter* spp. en biopsias gástricas, secreciones orales y materia fecal de perros”.**

**Guendulain, C.;** González, G.; Caffaratti, M.; González, P.; Tamiozzo, P.; Bessone, A.; Bagnis, G.; Galetto, M.; Illanes, N.

**XI Congreso Nacional de AVEACA,** Congreso Conmemoración 250 años de la profesión. Buenos Aires. 4 y 5 de Agosto de 2011.

**Presentación en poster: “Histopatología versus impronta de biopsia gástrica para el diagnóstico de *Helicobacter* spp. en perros”.**

**Guendulain, C.;** González, G.; González, P.; Caffaratti, M.; Babini, S.; Bessone, A.

**III Jornadas de Clínica de Pequeños Animales, FAV, UNRC, 22 y 23 de Septiembre de 2011.**

Res. CD N° 206/11.

**Presentación en poster: “Diagnóstico de *Helicobacter* spp. en perros: impronta versus histopatología de biopsia gástrica”.**

**Guendulain, C.;** González, G.; González, P.; Caffaratti, M.; Babini, S.; Bessone, A.; Bagnis, G.; Tamiozzo, P.

**XIII Congreso Nacional de AVEACA. Buenos Aires. 19 y 20 de Septiembre de 2013.**

**“Detección de *Helicobacter* spp. en biopsias gástricas, saliva y materia fecal en perros”.**

**Guendulain, C.;** González, G.; Babini, S.; Caffaratti, M.; González, P.; Bessone, A.; Tamiozzo, P.; Bagnis, G.

**VI Jornada Científico-Técnicas FAV. Río Cuarto. 14 de Noviembre de 2013.**

**“Histopatología versus impronta de biopsia gástrica para el diagnóstico de *Helicobacter* spp. en perros”.**

**Guendulain, C.;** González, G.; González, P.; Caffaratti, M.; Babini, S.; Bessone, A.

**VI Jornada Científico-Técnicas FAV. Río Cuarto. 14 de Noviembre de 2013.**

**“Detección de *Helicobacter* spp. en biopsias gástricas y en saliva y materia de perros”.**

**Guendulain, C.;** Tamiozzo, P.; Bessone, A.

**VI Jornada Científico-Técnicas FAV. Río Cuarto. 14 de Noviembre de 2013.**

**“Diagnóstico de *Helicobacter* spp. en perros: impronta versus histopatología de biopsia gástrica”.**

**Guendulain, C.;** González, G. González, P.; Caffaratti, M.; Babini, S.; Bessone, A.; Bagnis, G.; Tamiozzo, P.

**VI Jornada Científico-Técnicas FAV. Río Cuarto. 14 de Noviembre de 2013.**

**“Detección de *Helicobacter* spp. en biopsias gástricas, secreciones orales y materia fecal de perros”.**

**Guendulain, C.;** González, G.; Caffaratti, M.; González, P.; Tamiozzo, P.; Bessone, A.; Bagnis, G.; Galetto, M.; Illanes, N.

**VI Jornada Científico-Técnicas FAV. Río Cuarto. 14 de Noviembre de 2013.**

**Presentación en poster: “Detección de especies de *Helicobacter* en saliva de humanos y perros mediante la reacción en cadena de la polimerasa”.**

Guendulain, C.; Tamiozzo, P.; Gonzalez, G.; Bessone, A.

**XV Jornadas Argentinas de Microbiología.** Córdoba, Argentina, 14, 15 y 16 de Agosto de 2014.

**Presentación en poster: “Detección de *Helicobacter* sp. en materia fecal de cerdos en Argentina”.**

Tamiozzo, P.; Guendulain, C.

**VII Congreso de Producción Porcina del Mercosur**

**XII Congreso Nacional de Producción Porcina**

**XVIII Jornadas de Actualización Porcina.** Mar del Plata, 12 al 15 de Agosto de 2014.

**Presentación en poster: “Evaluación de la presencia de *Helicobacter* en biopsias gástricas y en saliva de perros”.**

Guendulain, C.; Tamiozzo, P.; Bessone, A.

**7ª Jornadas Veterinarias Latinoamericanas del Interior.** Rosario, 1 y 2 de Julio de 2011.

**Presentación en poster: “Detección de *Helicobacter bizzozeronii* y *Helicobacter felis* en biopsias gástricas de perros”.**

Guendulain, C.; González, G.; Pelliza, B.; Caffaratti, M.; González, P.; Bessone, A.; Tissera, M.C.; Tamiozzo, P.

**Congreso Veterinario Latinoamericano del interior, 2da. Edición.** Rosario, 2016.